

В.М. Петров, Л.Б. Пиотровский, И.А. Григорьев

Возбуждающие аминокислоты

L
Aug 1
6 p
01

Глубоко уважительно
Андрею Георгиевичу
в знак признательности
от авторов

Михайлов
Смирнов

Глубоко уважаемо му
Андрею Георгиевичу
в знак признательности
от авторов

Владимир
Смирнов

В.И.Г.

Возбуж
(нейрохимия)
потен

В.И.Петров, Л.Б.Пиотровский, И.А.Григорьев

Возбуждающие аминокислоты
(нейрохимия, фармакология и терапевтический
потенциал ВАКергических средств)

Монография

Волгоград
1997

Рецензент: К.С.Раевский - член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории нейрохимической фармакологии Научно-исследовательского института фармакологии РАМН, г.Москва

Монография одобрена и рекомендована к печати Ученым советом Волгоградской медицинской академии.

Монография профессора В.И.Петрова, доктора биологических наук Л.Б.Пиотровского и кандидата медицинских наук И.А.Григорьева посвящена изучению новой медиаторной системы - возбуждающих аминокислот (ВАК). Приоритетными являются вопросы ВАКергической нейротрансмиссии, участие ВАКсистемы в развитии патологических процессов в организме, создания новых оригинальных лекарственных средств на основе модификации молекул аспарагиновой и глутаминовой кислот. В основу монографии положен личный экспериментальный опыт авторов - клинического фармаколога, химика и фармаколога.

© В.И.Петров, Л.Б.Пиотровский, И.А.Григорьев

ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1
ГЛАВА 2

ГЛАВА 3

ГЛАВА 4

ГЛАВА 5

ГЛАВА 6

ГЛАВА 7

ГЛАВА 8

ЛИТЕРАТУРА

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислоты как медиаторы	7
ГЛАВА 2. Рецепторы возбуждающих аминокислот	
2.1. Классификация рецепторов ВАК	14
2.2. NMDA рецепторы	16
2.3. AMPA рецепторы	34
2.4. Каинатные рецепторы	40
2.5. L-AP4 рецепторы	42
2.6. Метаботропные рецепторы	44
ГЛАВА 3. Рецепторы ВАК в ЦНС	49
3.1. Распределение рецепторов ВАК	50
3.2. Системная организация ВАКергической нейротрансмиссии	52
ГЛАВА 4. Взаимодействие ВАКергической и других медиаторных систем	
4.1. Дофаминергическая система	59
4.2. ГАМКергическая система	64
4.3. Опиатергическая система	65
ГЛАВА 5. Участие ВАК в регуляции физиологических функций	
5.1. Сердечно-сосудистая система	68
5.2. Моторная активность	70
5.3. Психические функции	71
5.4. Долговременная потенция	73
5.5. Болевая чувствительность	80
5.6. Восприятие сенсорной информации	82
ГЛАВА 6. Роль ВАКергической системы в развитии патологических состояний	
6.1. Судорожные состояния	84
6.2. Гипоксия мозга	86
6.3. Нейротоксические свойства ВАК	87
ГЛАВА 7. Терапевтический потенциал ВАКергических средств	
7.1. Противосудорожное действие	91
7.2. Противогипоксическое действие	95
7.3. Нейродегенеративные расстройства	96
7.4. Анальгетическое действие	101
7.5. Анксиолитические свойства	103
7.6. Опиатная толерантность и зависимость	107
7.7. Основные лимитирующие факторы и возможные направления разработки лекарственных на основе лигандов рецепторов ВАК	112
ГЛАВА 8. Фармакологическая характеристика производных ВАК	
8.1. Аналоги ODAP	117
8.2. Пептидные аналоги N-ацетил-L-аспартил-L-глутаминовой кислоты	119
8.3. N-ацилпроизводные глутаминовой и аспарагиновой кислот	123
8.4. N-фталамоил-L-глутаминовая кислота - "суперкислый" агонист NMDA рецепторов	125
8.5. Производные имидазолдикарбоновой кислоты	126
8.6. Моделирование глутамат-связывающих сайтов	127
8.7. Липофильные производные ВАК	136
8.8. Фосфорилированные производные ВАК	137
ЛИТЕРАТУРА	149

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

BAK	возбуждающие аминокислоты
ВПСП	возбуждающий постсинаптический потенциал
ABPA	2-амино-3-(5-бромметил-3-гидроксиизоксазол-4-ил)пропионовая кислота
ACBC	1-аминоциклобутанкарбоновая кислота
(1S,3R)-ACBD	(1S,3R)-1-аминоциклобутан-1,3-дикарбоновая кислота
ACPA	2-амино-(3-карбокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота
ACPC	1-аминоциклопентанкарбоновая кислота
(1R,3R)-ACPD	(1R,3R) 1-аминоциклопентан-1,3-дикарбоновая кислота
ACPrC	1-аминоциклопропанкарбоновая кислота
AMPA	2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота
L-AP3	L-2-амино-3-фосфонопропионовая кислота
L-AP4	L-2-амино-4-фосфономасляная кислота
AP5	DL-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота
D-AP5	D-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота
AP7	DL-2-амино-7-фосфоногептановая кислота
D-AP7	D-2-амино-7-фосфоногептановая кислота
ATPA	2-амино-3-(3-гидрокси-5-третбутилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота
CGS19755	цис-4-фосфонометилпиперидин-2-карбоновая кислота
CGS37849	2-амино-4-метил-5-фосфопент-3-енкарбоновая кислота
CNQX	6-нитро-7-цианохиноксалин-2,3-дион
2R,3S,4S-CPG	(2R,3S,4S)-3,4-циклопропилглутаминовая кислота
2S,3R,4S-CPG	(2S,3R,4S)-3,4-циклопропилглутаминовая кислота
D-CPPene	D-3-(2-карбоксипиперазин-4-ил)проп-1-ен-1-фосфоновая кислота
D-CPP	D-3-(2-карбоксипиперазин-4-ил)пропил-1-фосфоновая кислота
D-CS	D-циклосерин
γ-DGG	γ-D-глутамилглицин
DNQX	6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион
GAMS	β-D-аспартиламинометилфосфоновая кислота
GIDAP	3N-глутарил-L-2,3-диаминопропионовая кислота
HA-966	3-амино-1-гидрокси-2-пирролидон
D-HCSA	D-гомоцистеинсульфиновая кислота
HomoQUIS	гомоквискваловая кислота
5-HPCA	3-гидрокси-4,5,6,7-тетрагидроизоксазоло[4,5-с]пиридин-5-карбоновая
7-HPCA	3-гидрокси-4,5,6,7-тетрагидроизоксазоло[4,5-с]пиридин-7-карбоновая
IBO	иботеновая кислота
NBQX	2,3-дигидрокси-6-нитро-7-сульфамоилбензо(F)хиноксалин
NMDA	N-метил-D-аспарагиновая кислота
NMDLA	N-метил-DL-аспарагиновая кислота
trans-2,3-PDA	транс-пиперидин-2,3-дикарбоновая кислота
PhGA	N-фталамоил-L-глутаминовая кислота
PtDAP	3N-фталамоил-L-2,3-диаминопропионовая кислота
ODAP	3N-оксалил-L-2,3-диаминопропионовая кислота
QUIS	квискваловая кислота
SuDAP	3N-сукцинил-L-2,3-диаминопропионовая кислота
TCP	1-[1-(Тиен-2-ил)циклогексил]пиперидин

ВВЕДЕНИЕ

Концепция нейромедиаторной роли возбуждающих аминокислот (ВАК) имеет долгую, достаточно увлекательную историю развития, которая в разные периоды времени отражала эволюцию понятий о синаптической передаче в ЦНС, происходящую в нейрофизиологии, нейрохимии и нейрофармакологии.

Гипотезу о медиаторной роли дикарбоновых аминокислот выдвинули еще в начале 60-х годов D. Curtis и J.C. Watkins. В то время они работали в лаборатории проф. J. Eccles в Австралийском Национальном Университете в Канберре (Австралия) и изучали влияние различных веществ на постсинаптические потенциалы нервных клеток. Используя новую для того времени технику микроэлектродной регистрации биопотенциалов нейронов и изучив более 120 соединений на препаратах изолированного спинного мозга лягушки и кошки, они обнаружили, что наиболее сильный возбуждающий эффект вызывало добавление в перфузионную среду L-глутаминовой, L-аспарагиновой и L-цистеиновой кислот [Curtis, Watkins, 1960]. На основании этих данных и была высказана гипотеза о том, что дикарбоновые аминокислоты - глутаминовая и аспарагиновая, являются медиаторами в возбуждающих синапсах, а монокарбоновые аминокислоты ГАМК, β -аланин и глицин, ингибирующие активность спинальных нейронов, могут быть медиаторами в тормозных синапсах.

Справедливости ради следует отметить, что за несколько лет до появления работ, цитированных выше, появилась статья Hayashi [1952], в которой автор описал судорожное действие L-глутамата и L-аспартата при введении в мозговые структуры или сонную артерию собак и обезьян. Однако именно нейрофизиологический подход, позволивший непосредственно регистрировать изменение синаптических потенциалов под действием дикарбоновых аминокислот, обеспечил перспективу и успех дальнейшего изучения ВАКергической передачи.

Существует ряд строгих критериев, по которым судят о том, является ли данное соединение нейромедиатором, то есть химическим переносчиком нервного импульса в синапсе. Эндогенное соединение можно считать нейромедиатором, если оно удовлетворяет следующим условиям:

1. пресинаптические окончания содержат это соединение и синтезирующую его ферментную систему;

2. раздражение соответствующих нервов приводит к высвобождению из пресинаптических окончаний достаточного количества этого соединения;

3. действие соединения на постсинаптическую мембрану воспроизводит эффект синаптической передачи;

4. в области синаптической щели существует система его инактивации;

5. блокаторы синаптической передачи должны блокировать эффекты, возникающие при введении этого соединения [Экклз, 1966; Комиссаров, 1986].

Как будет показано ниже, L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислоты удовлетворяют всем вышеперечисленным критериям и поэтому могут считаться нейромедиаторами.

Определяющим фактором для признания медиаторной роли ВАК послужило доказательство наличия специфичных рецепторов в головном мозге млекопитающих.

В настоящее время довольно много известно о селективности этих рецепторов, о функционировании связанных с ними каналов, из нервной ткани выделены рецепторные белки, некоторые типы рецепторов ВАК охарактеризованы биохимически, установлена анатомическая локализация различных типов рецепторов ВАК в головном мозге человека и животных [Herling, 1992].

Процессы возбуждения в ЦНС реализуются главным образом за счет функционирования ВАКергических синапсов, а появившиеся в последние годы многочисленные работы указывают на участие медиаторных дикарбоновых аминокислот в реализации ассоциативных, эмоциональных, вегетативных и других функций ЦНС.

Хотя в дальнейшем мы не будем останавливаться на этом, необходимо отметить, что рецепторы ВАК существуют и на периферии, где их роль заключается в модуляции различных функций периферических органов и тканей [Erdo, 1991]. Интересен также тот факт, что у насекомых, находящихся на более ранней ступени развития, чем млекопитающие, глутаматергическая система является основной в регуляции синаптической передачи в периферической нервной системе [Мандельштам, 1983].

ВАКергическая система, основная в передаче возбуждающего сигнала в ЦНС млекопитающих, привлекает пристальное внимание физиологов, фармакологов и химиков [Greenamyre, Porter, 1994; Петров, 1985; Раевский, 1986; Пиотровский, 1992]. Успехи в изучении медиаторной роли ВАК играют существенную роль в развитии современной биологии и медицины. Трудно также переоценить перспективы, которые откроются перед практической медициной после успешного решения задачи создания большого набора высокоизбирательных лигандов разных типов рецепторов ВАК, и создания на их основе лекарственных веществ, регулирующих функционирование этой нейромедиаторной системы. Поэтому исследования по изучению ВАКергической системы, поиск агонистов и антагонистов рецепторов ВАК имеют не только теоретическую, но и прямую практическую ценность.

Авторы выражают глубокую благодарность за помощь в написании этой книги к.х.н. М.А.Думпис, к.м.н. В.А.Сажину (1 глава) и к.м.н. А.Ю. Беспалову (7 глава).

ГЛАВА I. L-ГЛУТАМИНОВАЯ И L-АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТЫ КАК МЕДИАТОРЫ

Рассмотрим теперь, как выполняются перечисленные выше критерии нейромедиаторов для L-глутаминовой и L-аспарагиновой кислот.

L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислоты относятся к белковым аминокислотам, но в организме они встречаются и в мономерной форме. Их существование в различных тканях и органах: в том числе и в ЦНС, хорошо известно и не требует особых доказательств (рис.1).

Свидетельством наличия этих соединений в синаптических окончаниях служат данные о том, что они высвобождаются из срезов мозга или синапсом при различных деполяризующих воздействиях - таких как электростимуляция, высокая концентрация ионов калия в среде или добавление вератридина [Potashner, 1986]. Этот процесс зависит от концентрации ионов кальция - при наличии в среде кальциевого ионофора A23187 может произойти спонтанное выделение кислых аминокислот из синапсом даже в отсутствие деполяризующего фактора [Levi et al., 1976].

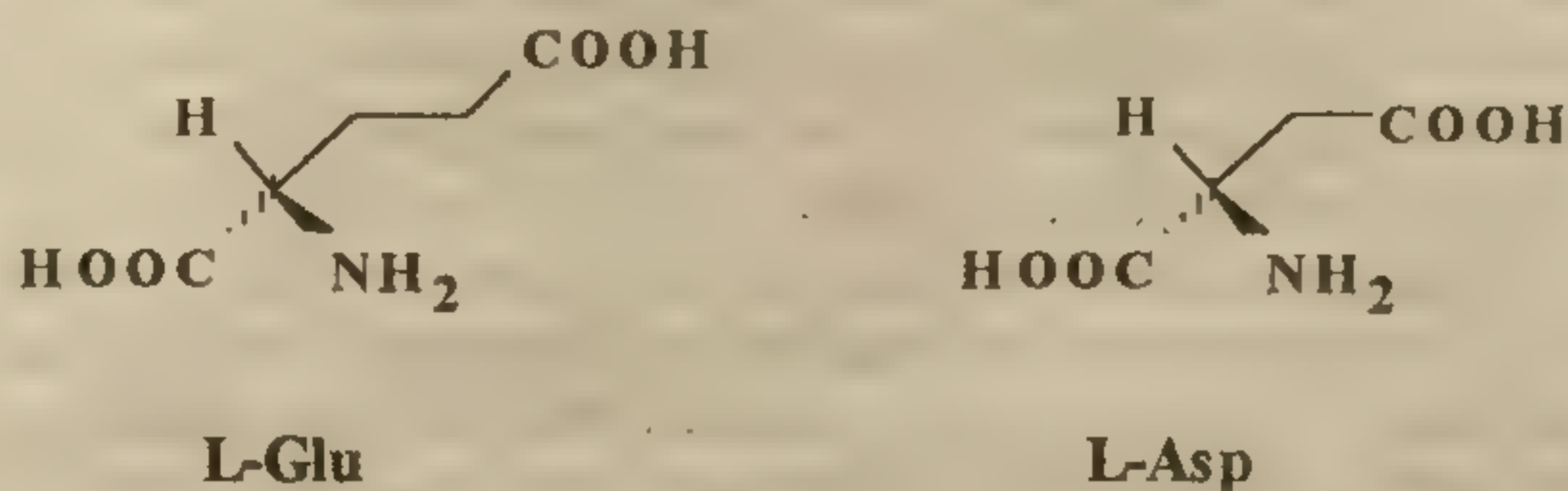


Рис.1 Структурные формулы L-глутаминовой и L-аспарагиновой аминокислот.

Несколько работ было выполнено по изучению процессов синаптического высвобождения глутамата и аспартата в отдельных структурах мозга. В опытах *in vitro* было показано выделение дикарбоновых аминокислот при стимуляции коллатералей Шаффера и комиссуральных путей в гиппокампе, а также в латеральном септуме [Mathe-Sorensen et al., 1980]. Сочетанием чувствительных биохимических методов с техникой повреждения нервных окончаний при аксотомии удалось доказать существование кальций-зависимого процесса высвобождения эндогенного глутамата в кортикостриатном тракте [Rowlands, Roberts, 1980]. Значительное количество работ, посвященных изучению высвобождения эндогенных дикарбоновых аминокислот-медиаторов в условиях *in vivo*, изложены в монографии О.В.Годухина "Модуляция синаптической передачи в мозге" [1987].

Для изучения процессов высвобождения нейромедиаторов из пресинаптических окончаний широко используется также методика оценки выделения меченых соединений из изолированных синапсом, предварительно аккумулировавших медиатор. Этот подход, с использованием меченой D-аспарагиновой кислоты, был применен для идентификации пресинаптических аминокислотных рецепторов [Ferkany, 1986]. Отметим тут же, что влияние различных классов психотропных веществ - антидепрессантов, нейролептиков, транквилизаторов и ноотропов на K⁺-стимулированное высвобождение D-аспартата из синапсом было изучено проф. Раевским и его сотрудниками [Ковалев и др., 1995].

Пути биосинтеза глутаминовой и аспарагиновой кислот, выполняющих медиаторную функцию в возбуждающих синапсах ЦНС, в настоящее время изучены недостаточно. Существенным препятствием для изучения процессов биосинтеза этих нейротрансмиттеров является трудность идентификации их медиаторного пула, поскольку обе эти аминокислоты участвуют в большом числе самых разнообразных биохимических реакций в нервных клетках.

Однако начатые в 60-70-х годах исследования по компартментализации различных пулов дикарбоновых аминокислот, по нейроно-глиальному циклу обмена глутамата и по локализации основных ферментов синтеза глутаминовой кислоты способствовали пониманию некоторых этапов сложного, многозвенного пути синтеза возбуждающих медиаторных аминокислот.

Основными метаболическими предшественниками эндогенной глутаминовой кислоты в мозге являются 2-оксоглутарат (α -кетоглутарат), образующийся при расщеплении глюкозы, глутамин, орнитин и аргинин. Большинство работ по метаболизму глутамата-нейромедиатора было посвящено участию в этом процессе 2-оксоглутарата и глутамина, так как именно эти два соединения в основном поддерживают постоянство концентрации медиатора в пресинаптических терминалях нейронов. Следует отметить существенную особенность биосинтеза глутамата-нейромедиатора, состоящую в том, что важное место в этом процессе занимают глиальные клетки, в частности астроциты, "поставщики" предшественников глутамата в нейрон.

Именно в астроцитах пировиноградная кислота (пируват), образующаяся в результате окислительного расщепления глюкозы, метаболизирует в цикле трикарбоновых кислот до 2-оксоглутарата, который в дальнейшем превращается в глутамин и глутамат. Пополнение пула аспарагиновой кислоты осуществляется за счет активации анаплеротического пути образования оксалацетата и малата из пировиноградной кислоты. Эта реакция катализируется биотин-содержащим ферментом пируваткарбоксилазой, который локализуется преимущественно (или исключительно) в астроцитарных клетках [Schank et al., 1985]. "Фиксация CO_2 на пирувате", осуществляемая пируваткарбоксилазой, протекает с участием ацетил-коэнзима А и требует затрат энергии за счет расщепления АТФ. Карбоксилирование пировиноградной кислоты в мозге усиливается при добавлении Mg^{2+} , K^+ и NH_4^+ в физиологических концентрациях, но тормозится глутаминовой кислотой. Это ингибирование, по-видимому, является механизмом реализации обратной отрицательной регуляции анаплеротического метаболического пути в астроцитах при накоплении в них избыточного количества глутамата. Образовавшиеся в астроцитах 2-оксоглутарат и малат транспортируются в нейроны с помощью специфических высокоаффинных Na^+ -зависимого (для 2-оксоглутарата) и Na^+ -независимого (для малата) переносчиков [Schank et al., 1985] и участвуют в дальнейшем в синтезе глутаминовой кислоты непосредственно в нейронах. Процесс транспорта этих предшественников через мембраны пресинаптической терминали ингибируется некоторыми метаболитами, включая глутаминовую и аспарагиновую кислоты и глутамин. Торможение экстрацеллюлярным глутаматом и аспартатом захвата 2-оксоглутарата и малата нейронами ($K_i=0.02 \text{ mM}$) может снизить уровень синтеза дикарбоновых аминокислот в пресинаптических окончаниях в случае гиперактивации ВАРгергических (глутаматергических) нейронов. Противоположным образом действует глутамин, который увеличивает V_{max} переносчиков малата и 2-оксоглутарата. По всей вероятности, этот феномен является частью физиологического процесса активации синтеза нейромедиатора, так как для

синтеза глутамата (или аспартата) в нейронах из 2-оксоглутарата (или малата) требуется источник аминокислотного "каркаса", в качестве которого используется поступающий в нейрон глутамин. Эндогенное нейроспецифическое соединение N-ацетиласпарагиновая кислота способна ингибировать захват 2-оксоглутарата синапсомы мозга 10- и 14-дневных мышей, однако функциональное значение этого явления пока не установлено [Schank et al., 1985].

Кроме 2-оксоглутарата и малата, предшественником глутамата-медиатора является также глутамин, который образуется в астроцитах из глутаминовой кислоты под действием фермента глутамин-синтетазы. Затем глутамин переносится в нейроны, где и превращается под действием фосфат-активируемой глутаминазы в глутамат.

Таким образом, из астроглии в пресинаптическую область нейронов посредством активного высокоспецифического транспорта поступают основные предшественники "медиаторного" глутамата - 2-оксоглутарат, малат и глутамин. Именно за счет этих веществ, проходящих через каскад метаболических превращений в митохондриях, внутренней мембране и цитоплазме нейрона, происходит пополнение медиаторного пула глутаминовой кислоты. В одной из недавних работ предложена схема этого процесса, которая достаточно объясняет пути образования "синаптического" глутамата [Palaiologos et al., 1988]. Поступивший в нейрон глутамин превращается в глутамат в митохондриальном интрамембранном пространстве под действием фосфат-стимулируемой глутаминазы, которая локализуется на наружной поверхности мембраны. Затем глутамат переносится через внутреннюю мембрану с помощью митохондриального аспартат/глутамат специфического переносчика [Passarella et al., 1987]. В матриксе глутамат вступает в реакцию переаминирования с оксалацетатом с образованием 2-оксоглутарата и аспарагиновой кислоты, которые в свою очередь транспортируются в цитоплазму. В результате реакции обратного переаминирования из аспартата и 2-оксоглутарата образуются оксалацетат и глутамат. Под действием деполяризующего стимула последний выходит в синаптическую щель, где и выполняет функцию химического переносчика нервного импульса, то есть нейромедиатора.

В рамках этой схемы ключевая роль в биосинтезе глутамата-медиатора в нейроне отводится ферменту аспартат-аминотрансферазе, ингибирование которого аминокислотой существенно снижает кальций-зависимое высвобождение медиатора из клеток мозжечка мышей [Palaiologos et al., 1988]. К подобному эффекту приводит также действие на культуру нейронов фенилсукцината - ингибитора переносчика кетокислот и дикарбоновых кислот через внутреннюю мембрану митохондрий.

Уровень эндогенных глутаминовой и аспарагиновой кислот в мозговой ткани определяется активностью целого ряда ферментов, среди которых наибольшее значение имеют глутаминаза, глутамин-синтетаза, глутаматдегидрогеназа и аспартатаминотрансфераза. Мы попытаемся дать краткую характеристику каждого из указанных ферментов и их роли в биосинтезе глутамата(аспартата)-медиатора.

Фосфат-активируемая глутаминаза, катализирующая гидролитическое расщепление глутамина до глутамата и аммиака, относится к митохондриальным ферментам, и ее активность модулируется целым рядом факторов - прежде всего фосфатом и глутаминовой кислотой [Kvamme, 1983]. Участие глутаминазы в биосинтезе медиаторного пула глутамата нашло свое подтверждение в опытах, в которых был показан перенос радиоактивной метки из глутамина в глутаминовую кислоту, высвобождающуюся из срезов мозга [Hamberger et al., 1979] и синапсом

при деполяризации [Bradford et al., 1978]. Глутаминаза преимущественно обнаруживается в нейронах, но не в астроглии [Patel et al., 1995]. Сведения об изменении активности глутаминазы при повреждении ВАКергических путей в различных отделах головного мозга довольно противоречивы. С помощью иммуноцитохимических методов глутаминаза обнаружена в некоторых областях мозга, характеризующихся преобладанием ВАКергических нейронов. В гиппокампе наибольшая глутаминазная активность определяется в терминалях мшистых волокон [Altshuller et al., 1985]. Кроме того, этот фермент идентифицирован в телах нейронов, от которых берут начало перфорантный путь и мшистые волокна, а также в гранулярных клетках зубчатой извилины. Пирамидные клетки новой коры, расположенные в V и VI слоях, проявляют иммунопозитивную реакцию на глутаминазу [Liu et al., 1989], что подтверждает предположение о происхождении кортикофунгальных ВАКергических путей из этих клеток. В мозжечке глутаминаза определяется гистохимически в основном в телах гранулярных клеток.

Обратная реакция превращения глутамата в глутамин катализируется глутаминсинтетазой. Важной особенностью этого фермента является его преимущественная локализация в глиальных клетках (астроцитах) по сравнению с нейронами [Horenberg, 1983].

Митохондриальный фермент глутаматдегидрогеназа участвует в превращении глутаминовой кислоты в 2-оксоглутарат (и наоборот) в нервных клетках. По мнению Patel и соавт. [1995] этот фермент, подобно глутаминсинтетазе, в основном функционирует в глии, однако ряд экспериментальных данных свидетельствует об обратном [Hertz, 1979]. Повреждение кортико-стриатного ВАКергического пути не вызывает изменений в активности глутаматдегидрогеназы стриатума, и лишь незначительное уменьшение активности фермента в гиппокампе отмечается при разрушении коллатералей Шаффера [Wolf et al., 1993].

Пиридоксаль-зависимый фермент аспартат-аминотрансфераза катализирует превращение аспартата в оксалацетат и 2-оксоглутарата в глутамат, а также обратную реакцию переаминирования [Palaiologos et al., 1988]. Этот фермент известен в двух изоформах - митохондриальной и цитоплазматической. Участвуя в биосинтезе и деградации нейронального аспартата, он может поддерживать на необходимом уровне количество не только глутамата, но и аспартата-медиатора [Shank, Campbell, 1985]. Иммуноцитохимическое определение аспартат-аминотрансферазы (цитоплазматический изоэнзим) в церебральных структурах показало, что он обнаруживается не только в ВАКергических нейронах (фоторецепторы, слуховой нерв, гранулярные клетки мозжечка), но и в ГАМКергических тормозных нейронах (звездчатые и корзинчатые клетки мозжечка, нейроны II и III слоев неокортекса [Kamisaki et al., 1984]. Опыты с повреждением ВАКергических путей и определением активности фермента не позволили получить однозначных результатов, доказывающих избирательность связи аспартат-аминотрансферазы с функционированием ВАК в синапсах. В частности, не отмечено изменения активности фермента в стриатуме и гиппокампе после разрушения ВАКергической иннервации этих структур из коры и перфорантного пути соответственно [Ferkany, 1986]. Снижение активности аспартат-аминотрансферазы наблюдалось только в вентральном кохлеарном ядре спустя две недели после перерезки волокон слухового нерва, в которых нейронпередача опосредуется рецепторами ВАК [Wenthold, 1980].

Литературные данные по метаболизму аспарагиновой и глутаминовой кислот свидетельствуют о значительных экспериментальных трудностях при идентификации и изучении процессов образования медиаторного (пресинапти-

ческого) пула возбуждающих аминокислот (ВАК). Это обусловлено не только методическими ограничениями, связанными с широкой распространенностью этих аминокислот в организме, но и со сложностью нейрохимической системы, поддерживающей уровень глутаминовой (аспарагиновой) кислоты в пресинаптических окончаниях. Как уже указывалось выше, для нормального функционирования возбуждающих аминокислот как нейротрансмиттеров [удаления их из синаптической щели, метаболической деградации (метаболических превращений), биосинтеза медиаторного пула в пресинаптическом окончании] необходима тесная взаимосвязь между глияльными клетками (астроцитами) и нейронами, так как именно в глии образуются предшественники глутамата-медиатора - глутамин, 2-оксоглутарат и малат. Именно отсюда эти предшественники поступают в нейроны. Их метаболические превращения, перенос через внешние и внутренние клеточные мембраны происходят с участием большого набора ферментов, транспортных мембранных систем и энергетических субстратов, которые принимают участие или сопряжены с другими биохимическими процессами в нервной ткани, а в ряде случаев и дублируют друг друга.

Фармакокинетический анализ метаболизма меченых предшественников нейрональных аминокислот показал, что процессы синтеза и биodeградации ГАМК, глутаминовой кислоты, глутамина и аспарагиновой кислоты в первом приближении могут быть описаны двухкомпарментной моделью [Fykse, Fonnum, 1991]. Сразу же после введения меченых по углероду алифатических кислот (уксусной, пропионовой и масляной) или аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая, ГАМК, лейцин) отношение величин радиоактивности глутамин/глутамат превышало 1.0, в то время как после введения глюкозы, пировиноградной и молочной кислот, глицерина и оксibuтирата отношение было значительно меньше 1.0. Эти результаты были интерпретированы с позиции существования двух компарментов (пулов) глутамата: первая группа предшественников стимулировала синтез этой аминокислоты в малом пуле, сопряженном с биосинтезом глутамина; а вторая группа предшественников преимущественно влияла на большой пул глутамата, не связанный с процессами биосинтеза глутамина. В последующем детальные исследования кинетических кривых меченых предшественников глутаминовой кислоты показали, что возможно описание процесса биосинтеза ее медиаторного пула с помощью пятикомпарментной модели [van den Berg et al., 1978].

Известны два основных пути удаления медиатора из синаптической щели. Первый путь - инактивация молекулы медиатора специфическим ферментом, присутствующим в синаптической щели. Примером этого служит гидролиз ацетилхолина ацетилхолинэстеразой. Второй путь - это удаление медиатора из синаптической щели специфическими системами обратного захвата.

Системы обратного захвата были обнаружены для большинства медиаторов в ЦНС (тормозных аминокислот - глицина и ГАМК, моноаминов - дофамина, серотонина, норадреналина и др.), что свидетельствует об универсальности этого процесса. Важным шагом вперед для понимания медиаторных процессов в ЦНС, доказательства медиаторной роли дикарбоновых аминокислот, а также существования ВАКергических нейронов явилось обнаружение специфической для L-глутамата и L-аспартата системы транспорта [или обратного захвата (uptake)] в нервное окончание [Balcar, Johnston, 1972]. Необходимым условием для

осуществления транспорта глутамата в нервное окончание является присутствие в среде ионов натрия, причем для переноса одной молекулы аминокислоты требуется участие двух ионов натрия [Stallcup et al., 1979].¹

Сравнительное изучение Na^+ -зависимого связывания аминокислот с синапсосомами и последующего их транспорта в синапс показало, что среди множества различных аминокислот именно глутаминовая и аспарагиновая кислоты имеют свою высокоселективную систему транспорта [Clements, 1996], которая характеризуется одинаковым соотношением захвата глутамата/аспартата для различных структур мозга [Ferkany, 1986]. То есть эти системы характеризуются высокой специфичностью к L-глутаминовой и L-аспарагиновой кислотам, эндогенным лигандам рецепторов ВАК. Интересно отметить, что эта система обратного захвата может осуществлять перенос в нервное окончание D-аспартата, который, по всей вероятности, играет роль "ложного" медиатора [Lund-Karlsen, Fonnum, 1976]. Важной особенностью D-изомера аспарагиновой кислоты является его высокая устойчивость к метаболическому распаду, поэтому он нашел широкое применение в нейрехимии при идентификации и изучении процессов обратного захвата ВАК нейронами в различных отделах ЦНС. (Удобными моделями для подобных исследований являются синапсосомы или тонкие мозговые срезы толщиной не более 200 μm).

В опытах с перерезками различных нервных путей, при использовании различных биохимических и радиоизотопных методов, были обнаружены отделы мозга, в которых дикарбоновые аминокислоты осуществляют передачу синаптического возбуждения, а также глутаматергические проекции. В частности, с использованием этого методического приема были выявлены ВАКергические кортикофунгальные пути, оканчивающиеся в амигдале, в красном ядре и спинном мозге [Young et al., 1996], в прилежащем ядре, волокнах форникса и гиппокампе [Walaas, Fonnum, 1980], в неостриатуме и таламусе [Fonnum et al., 1984], а также в других структурах мозга.

Глутаминовая и аспарагиновая кислоты могут также захватываться глиальными клетками, иногда даже с большим аффинитетом, чем нейронами. В частности, в культуре нервной ткани в самих ВАКергических нейронах система захвата для глутамата обладает меньшей аффинностью, нежели аналогичная система в астроцитах [Drejer et al., 1982]. Не вызывает сомнений, что процесс поглощения глутамата (аспартата) глией имеет определенное физиологическое значение. Большинство исследователей полагает, что этот процесс является одной из стадий

¹От концентрации натрия в среде зависит механизм обратного захвата не только глутаминовой кислоты, но и ГАМК (мозг крысы, нервная система насекомых), серотонина (мозг крысы, тромбоциты), глицина (мозг крысы, эритроциты), норадреналина и дофамина (мозг крысы). Кроме ионов натрия, в транспорте этих медиаторов участвуют и другие ионы, которые образуют пару с ионом натрия и создают "электрогенный" насос для переноса медиатора через мембрану. При обратном захвате ГАМК, глицина, дофамина или норадреналина в качестве парного иона выступает ион хлора, серотонина - ионы хлора и калия. Глутамат составляет исключение из этого ряда - в его движении внутрь нервного окончания в качестве дополнительного иона участвует ион калия. Эти ионы, в отличие от ионов натрия, находятся внутри синапса и, после переноса медиатора через мембрану внутрь окончания, ответственны за возврат переносчика на наружную поверхность для осуществления следующего цикла переноса [Kanner, Radian, 1986].

метаболического превращения глутаминовой кислоты в глутамин в глиальных клетках, с последующим превращением снова в глутаминовую кислоту, но уже в нейронах. Тем самым глутаминовая кислота оказывается в "медиаторном" пуле, откуда она и способна высвободиться в синаптическую щель. Сам процесс субстратной специфичности от такового в нейронах [Balcar et al., 1972]. Однако известен селективный ингибитор поглощения дикарбоновых кислот глией - 4-ацет-амино-4-изотиоциано-2,2-дисульфат стильбена [Waniewski, Martin, 1983]. Показано также, что высокоактивным и селективным ингибитором транспорта глутамата в мозжечке является (2S,1'S,2'S,3'S)-2-(2-карбокси-3-мет-оксиметилциклопропил)глицин [Ferkany, 1986].

Процессы обратного захвата нейронами глутамата или аспартата могут стать мишенью для действия лекарственных веществ. Соединения, способные блокировать этот процесс, будут потенцировать возбуждающую передачу в синапсах ЦНС, что может рассматриваться как альтернативный путь лечения ишемии мозга. Два таких соединения описаны - это L,D-трео-3-гидро-ксиаспарагиновая и, возможно, дигидрокаиновая кислоты, которые способны пролонгировать действие L-глутамата на нейроны таламуса и спинного мозга [Watkins, Evans, 1981; Lodge et al, 1990; Johnston et al., 1974]. Однако пока этот путь управления функциями ВАКергической возбуждающей системы практического воплощения не нашел. Правда, появились данные о терапевтическом потенциале ингибиторов высвобождения глутамата. Одним из таких соединений является BW161C89 [4-амино-2-(4-метилпиперазин-1-ил)-5 - (2,3,5-трихлорфенил)пиримидин] [Leach et al., 1993].

Вся совокупность данных, изложенных в этой главе, однозначно свидетельствует о том, что L-глутаминовая и L-аспаргиновая кислоты присутствуют в синаптических окончаниях. Эти структуры содержат ферментные системы их синтеза и системы, обеспечивающие их высвобождение в синаптическую щель под действием определенных стимулов. На постсинаптической мембране для молекул L-глу-таминовой и L-аспаргиновой кислот существуют места специфического связывания, в результате взаимодействия с которыми возникает физиологический ответ. Существует система обратного захвата этих соединений, регулирующая их концентрацию в синаптической щели. Как будет показано дальше, известно много природных и синтетических соединений, оказывающих идентичное L-глутаминовой (и L-аспарагиновой) кислоте влияние на синаптическую передачу и постсинаптические эффекты.

Таким образом, L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислоты удовлетворяют всем вышеперечисленным критериям, предъявляемым к нейромедиаторам, и могут быть отнесены к их числу.

ГЛАВА 2. РЕЦЕПТОРЫ ВОЗБУЖДАЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ

2.1 Классификация рецепторов ВАК

Прежде чем перейти к изложению классификации рецепторов ВАК, необходимо хотя бы коротко описать путь, по которому прошли исследователи при открытии и идентификации этих рецепторов, что, несомненно, поможет понять принципы, положенные в основу современной классификации.

Как уже было сказано, возбуждающее действие L-глутаминовой и других кислых аминокислот сначала было установлено на нейронах спинного мозга [Curtis et al. 1959; Curtis et al., 1960], а затем и на нейронах других отделов ЦНС [Krnjevic, Phillis, 1963]. При этом только внеклеточная аппликация этих аминокислот, а не их введение в клетку, приводило к деполяризации нейронов. Самый сильный эффект проявила N-метил-D-аспарагиновая кислота (NMDA) [Curtis et al., 1960]. Это и позволило выдвинуть предположение о существовании мембранных рецепторов, управляющих электрической возбудимостью постсинаптической мембраны, для L-глутаминовой кислоты и ее аналогов.

Была даже предложена "трехточечная" схема строения узнающего центра этих рецепторов [Curtis, Watkins, 1960]. В рамках этой схемы возбуждающее действие могут оказывать только кислые аминокислоты и их аналоги, в которых α -аминокислотная группировка отделена от дистальной кислотной группы цепочкой из 2-3 метиленовых групп. Отрицательно заряженные кислотные группы и протонированная аминогруппа взаимодействуют, соответственно, с двумя положительно и одним отрицательно заряженными пунктами в связывающем сайте рецептора.

Однако в последующих работах была установлена различная регионарная чувствительность нейронов мозга млекопитающих к деполяризующему действию кислых аминокислот [McLennan et al., 1979]. В частности, L-глутаминовая кислота значительно превосходила L-аспарагиновую по возбуждающему эффекту при подведении к интернейронам задних рогов спинного мозга, в то время как при тестировании этих аминокислот на клетках Реншоу передних рогов наблюдались противоположные результаты [Johnson et al., 1987]. Эти исследования позволили предположить существование двух типов рецепторов ВАК - "аспартат-чувствительных" и "глутамат-чувствительных", что послужило отправной точкой для поиска специфичных антагонистов этих рецепторов.

Решающую роль в этих поисках сыграло открытие антагонистического действия диэтилового эфира L-глутаминовой кислоты (ДЭЭГ) и D-2-аминоадипиновой кислоты, блокирующих действие разных ВАК с различной эффективностью [Haldeman, McLennan, 1972], что и позволило установить наличие гетерогенной популяции рецепторов ВАК и разделить их на два класса: NMDA- и неNMDA типы [Davies, Watkins, 1982].

В результате дальнейших исследований с использованием современных методов электрофизиологии, радиолигандного связывания и молекулярной биологии было установлено, что в ЦНС млекопитающих существуют четыре типа ионотропных рецепторов ВАК, управляющих проницаемостью ионных каналов, и семейство метаботропных рецепторов ВАК, связанных с G-белком.

Современная классификация ионотропных рецепторов основана на разной их чувствительности к действию N-метил-D-аспарагиновой (NMDA), 2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовой (AMPA), каиновой и L-2-амино-4-фосфономасляной (L-AP4) кислот. Названия этих соединений, наиболее селективных лигандов данного типа рецепторов, и были присвоены соот-

ветствующим типам рецепторов - NMDA, AMPA, каинатный и L-AP4 типы, соответственно. Правда, первые три названы по избирательным агонистам, тогда как в последнем случае использовано название наиболее селективного антагониста.

Следует отметить, что в начале исследований по физиологии и фармакологии рецепторов ВАР рецепторы AMPA типа называли квисквалатным, по названию наиболее селективного из известных тогда агонистов - квискваловой кислоты, природной аминокислоты, выделенной из семян растения *Quisqualis fructus*. В электрофизиологических экспериментах она стимулировала возбуждающие рецепторы рака, лягушки и млекопитающих [Takemoto, 1978].

Однако исследования последних лет показали нецелесообразность использования этого названия для одного из ионотропных рецепторов ВАР. В первую очередь это связано с тем, что квискваловая кислота является также лигандом metabotropicных рецепторов ВАР [Schoep et al., 1991]. Следует также отметить, что квискваловая кислота - соединение с весьма широким спектром действия, и способна влиять на различные биохимические и мембранные системы в нервных клетках не только за счет активации соответствующих ионотропных рецепторов, но и по иному механизму - например, квисквалат тормозит натрий-зависимое выделение глутаминовой кислоты в нейронах. Упомянем также пока еще не нашедший объяснения факт взаимодействия квисквалата с рецептором L-AP4 типа. При инкубации срезов гиппокампа в среде, содержащей квисквалат, уже через несколько минут отмечается повышение чувствительности нейрональных ответов к блокирующему действию L-AP4 [Johnson, Koerner, 1988].

Поэтому, когда было обнаружено, что более активным и селективным агонистом этого типа рецепторов является синтетическая 2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота (AMPA) [Brehm et al., 1988], за ними утвердилось название AMPA рецепторы.

При изучении ответов ЦНС млекопитающих на стимуляцию квисквалатом и каинатом очень часто наблюдается определенное сходство, такое же сходство наблюдается в чувствительности этих ответов к антагонистам. В связи с этим возникает вопрос - являются рецепторы неNMDA типа одним или несколькими образованиями. Другими словами - существуют ли отдельно рецепторы AMPA и каинатного типа? Известны и другие работы, в которых обсуждается сходство и различие этих двух типов рецепторов [см., например, Kiskin et al., 1986; Sakimura et al., 1990; Krogsgaard-Larsen et al., 1991]. Существует мнение, что в основе некоторых эффектов, индуцируемых каинатом в ЦНС млекопитающих, лежит активация AMPA рецепторов. Однако данные радиолигандного анализа показывают, что ^3H -AMPA и ^3H -каинат сильно отличаются друг от друга по избирательности связывания и распределению мест связывания [Foster, Fagg, 1984]. Более того, молекулярная масса структуры, содержащей сайт высокоаффинного связывания ^3H -каината, составляет 76 кДальтон и этот рецептор чувствителен к ионам Ca^{2+} . Масса соответствующей структуры для ^3H -AMPA составляет 51.6 кДальтон и этот рецептор не чувствителен к действию ионов кальция. При этом AMPA рецептор существует как равновесная смесь двух различных конформационных состояний, причем на положение равновесия влияют ионы SCN^- [Watkins, 1991]. Данные молекулярно-биологических исследований по клонированию и выделению ВАР-рецепторных белков также свидетельствуют о различии этих рецепторов [Seeburg, 1993].

Метаботропные рецепторы ВАР чувствительны преимущественно к действию L-глутаминовой, квискваловой и транс-1-аминоциклопентан-1,3-дикарбоновой (ACPD) кислот. Действие этих рецепторов конкурентно блокируется

2-амино-3-фосфонопропионовой кислотой. По современным данным семейство метаботропных рецепторов включает в себя семь подтипов (mGluR1-mGluR7) [Masu et al., 1991; Abe et al., 1992; Takashahi et al., 1993; Gabellini et al., 1993; Okamoto et al., 1994]. Белки этих рецепторов кодируются разными РНК [Tanabe et al., 1993], и рецепторы отличаются друг от друга по избирательности действия агонистов и физиологическим функциям. Подробнее эти вопросы мы рассмотрим в соответствующей главе.

Подчеркнем еще раз тот факт, что лиганды рецепторов ВАК в подавляющем большинстве случаев представляют собой соединения, в молекулах которых присутствуют две кислотные и одна основная функции. От природы кислотных функций, замещенности аминогруппы, расстояний между фармакофорными группами и конформационной подвижности молекулы зависит степень предпочтительности взаимодействия данного соединения с тем или иным типом рецептора.

Таким образом, нейромедиаторная система ВАК, подобно другим нейромедиаторным системам, представляет собой совокупность различных типов рецепторов, отличающихся друг от друга строением (канальные ионотропные или связанные с G-белком), распределением в ЦНС и функциональной значимостью. Ниже мы рассмотрим подробнее эти типы рецепторов.

2.2. NMDA рецепторы

В настоящее время из всех типов рецепторов ВАК рецептор NMDA типа изучен наиболее подробно. В первую очередь это связано с тем, что именно для этих рецепторов были открыты первые конкурентные антагонисты - 2-амино-ω-фосфонокарбоновые кислоты.

Изучение действия на NMDA рецепторы различных классов соединений показало, что постсинаптический NMDA рецептор представляет собой сложное надмолекулярное образование, включающее в себя несколько сайтов регуляции - сайт специфического связывания медиатора (L-глутаминовой кислоты), сайт специфического связывания коагониста (глицина) и аллостерические модуляторные сайты, расположенные как на мембране (полиаминовый), так и в ионном канале, сопряженном с рецептором (сайты связывания двухвалентных катионов и "фенциклидиновый" сайт - участок связывания неконкурентных антагонистов). Поэтому в дальнейшем мы будем, наряду с термином NMDA рецептор, использовать и термин NMDA-рецепторно-ионофорный комплекс, подчеркивая тем самым сложность его строения и множественность возможностей регуляции его функций.

К особенностям всего NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса относятся: 1) хемо- и потенциал-чувствительности одновременно; 2) медленная динамика и определенная частотная характеристика запуска; 3) длительность эффекта; 4) потенциал - чувствительное "окно" (-30 - -20 мВ); 5) способность к временной суммации и усилению вызванного потенциала [Jose et al., 1996].

Работы по выделению NMDA-рецепторных белков и по установлению их молекулярной массы с помощью техники радиационной инактивации указывают, что масса комплекса, включающего в себя сайты связывания агонистов, конкурентных и неконкурентных антагонистов, и глицина составляет около 120 000 дальтон [Wong, Kemp, 1991].

Однако популяция NMDA-рецепторно-ионофорных комплексов в организме млекопитающих не гомогенна. Показано, что в головном мозге существуют NMDA-рецепторы с преимущественным сродством к агонистам (стриатум,

мозжечок) или к таким антагонистам, как AP5 или CPP (неокортекс, таламус) [Olverman et al., 1986]. О функциональной гетерогенности NMDA рецепторов см. также [Григорьев и др., 1989, 1992, 1993; Wlaz et al., 1994; Nakanishi et al., 1994; Monyer et al., 1994; Ishii et al., 1993].

Работы по выделению и анализу генов, кодирующих NMDA-рецепторные белки, показали, что NMDA рецептор может быть реконструирован в виде гетеромерной структуры из двух типов субъединиц, одна из которых всегда субъединица NMDAR1, а вторая - одна из четырех NMDAR2 субъединиц (NMDAR2A-NMDAR2D) [Seeburg, 1993]. Субъединица NMDAR1 является ключевой, так как обладает всеми свойствами, характерными для NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса - избирательность к агонистам и антагонистам, действие глицина, потенциал-зависимая блокада ионами магния, ингибирование ионами цинка и проницаемость канала для ионов кальция [Moriyoshi et al., 1991; Sugihara et al., 1992; Karp et al., 1993]. Субъединицы NMDAR2A-D не образуют канал, но в сочетании с субъединицей NMDAR1 потенцируют активность всего комплекса [Ishii T. et al., 1993]. мРНК субъединицы NMDAR1 экспрессируется во всех нейрональных клетках всех отделов мозга, тогда как экспрессия субъединиц NMDAR2A-D не одинакова в разных областях [Moriyoshi K. et al., 1991; Ishii et al., 1993]. Поэтому включение того или иного подтипа субъединицы NMDAR2 в гетеромерный комплекс определяет вариабельность рецептора. То есть, функциональная гетерогенность NMDA рецепторов в различных нейрональных клетках определяется функциональными и анатомическими различиями субъединиц NMDAR2 [Sheng et al., 1994; Farrant et al., 1994; Priestley, Kemp, 1994; Standaert et al., 1994]. Однако соотношение субъединиц, входящих в состав рецепторного комплекса, зависит не только от типа ткани, но и изменяется с возрастом [Monyer et al., 1994].

От субъединичного состава рецепторного комплекса зависят не только параметры сродства лигандов (как агонистов, так и антагонистов) к глутамат-связывающему сайту NMDA рецептора [Laurie, Seeburg, 1994; Lynch et al., 1994], такие "изорецепторы" отличаются аффинностью к агонистам и антагонистам других сайтов - глицинового, полиаминового и канального (неконкурентные антагонисты) сайтов [Kraus et al., 1994; Yoneda et al., 1994; Priestley, Kemp, 1994].

Агонисты и конкурентные антагонисты глутамат-связывающего сайта NMDA рецепторов. К истинным агонистам и конкурентным антагонистам NMDA рецепторов относятся соединения, способные избирательно взаимодействовать непосредственно с глутамат-связывающим сайтом рецептора, участком узнавания медиатора. В отличие от них, неконкурентные антагонисты модулируют активность NMDA рецепторно-ионофорного комплекса, связываясь с другими молекулярными структурами в рецепторе, а коагонист глицин имеет свой специфический узнающий сайт.

Выявление и идентификация агонистов и конкурентных антагонистов NMDA рецепторов проводится с использованием модели конкурентного ингибирования специфического связывания меченого лиганда с последующим исследованием характера действия этих соединений на синаптическую передачу на нейрональных моделях. Этот метод дает наиболее адекватную оценку относительной активности подобных соединений, так как данные электрофизиологических опытов не отражают реальной степени взаимодействия агониста с рецептором. В этих экспериментах суммарный нейрональный ответ зависит от целого ряда факторов, действующих в этой биологической системе: активации других рецепторов,

активности систем захвата, прохождения вещества через мембраны и др. [Watkins, Olverman, 1988].

Особенности строения агонистов. Из эндогенных соединений агонистами NMDA рецепторов являются сама L-глутаминовая кислота (однако она не является специфичным агонистом, а действует на все типы рецепторов ВАР) и хинолиновая кислота - один из продуктов метаболизма триптофана [Lapin, Politi, 1993; Lapin, Ryzov, 1990; Stone, 1993].

К агонистам NMDA рецепторов относится также природная иботеновая кислота, представляющая собой аналог мусцимола, агониста ГАМК рецепторов, с карбоксильной группой в боковой цепи. Подчеркнем одну интересную особенность, связывающую между собой ГАМКергические и ВАРергические вещества - во многих случаях, аналогичных упомянутому выше, различие в химическом строении агонистов заключается лишь в отсутствии карбоксильной группы в α -положении к аминогруппе. Так, например, отличаются друг от друга γ -аминомасляная и глутаминовая кислоты.

Агонистами глутамат-связывающего сайта NMDA рецепторов являются сама NMDA, иботеновая (IBO), транс-пиперидин-2,3-дикарбоновая (trans-2,3-PDA), D-гомоцистеинсульфиновая (D-HCSA), (1S,3R)-1-аминоциклобутан-1,3-дикарбоновая (ACBD), (1R,3R)-1-аминоциклопентан-1,3-дикарбоновая кислота (ACPD), (2S,3R,4S)- и (2R,3S,4S)-3,4-циклопропилглутаминовые (2S,3R,4S-CPG и 2R,3S,4S-CPG, соответственно) кислоты (см. рис. 2.1). Среди других агонистов обращает на себя внимание (RS)-(тетразол-5-ил)глицин - наиболее активный из известных агонистов глутамат-связывающего сайта NMDA рецепторов [Schoepp et al., 1991; Lunn et al., 1992]. Формально его молекула не содержит у β -углеродного атома карбоксильной группы. Роль дистальной кислотной группы в этой молекуле выполняет кислый гетероциклический остаток. Поэтому можно говорить, что молекулы всех этих соединений содержат все три группы, входящие в состав ВАРергического фармакофора: две кислотные и одну основную.

Для агонистов NMDA рецепторов характерны следующие структурные особенности: короткая цепочка, соединяющая терминальные кислотные функции; предпочтительность замещения атома азота аминогруппы; D-конфигурация хирального центра. Агонистическая активность определяется природой ω -кислотной функции и убывает в ряду $\text{COOH} > \text{SO}_3\text{H} > \text{PO}_3\text{H}_2$ [Пиотровский, 1987].

Однако в настоящее время известны и соединения, содержащие несколько иной фармакофор, например, N-фталамоил-L-глутаминовая кислота (PhGA) [Kiskin et al., 1991].

То, что PhGA является избирательным агонистом NMDA рецепторов, было обнаружено в электрофизиологических опытах на пирамидальных нейронах гиппокампа крыс. Это следует из того, что: а) ответ на его действие появлялся только в присутствии глицина, селективного модулятора NMDA рецепторов; б) обратный потенциал индуцируемых им токов был идентичен таковому для аспартат-индуцируемых токов; в) вызванный им ответ избирательно блокировался ионами Mg^{2+} , блокатором ионных каналов NMDA рецепторов, конкурентным (D-AP5) и неконкурентным (кинуренатом) NMDA антагонистами; г) наблюдалась полная перекрестная десенситизация ответов на аспартат и PhGA. Однако максимальный ответ, вызываемый этим соединением, значительно меньше, чем ответы на аспартат и NMDA. В отличие от большинства других агонистов рецепторов ВАР, молекула PhGA не содержит амина-, но зато содержит три карбоксильные группы. Необходимость ароматической карбоксильной группы для проявления NMDA агонистического действия следует из того, что его

дезкарбоксияналог, N-бензоил-L-глутаминовая кислота, таким действием не обладает. Поэтому PhGA была названа "суперкислым" агонистом NMDA типа [Kiskin et al., 1991].

Изучение влияния PhGA на связывание ^3H -L-Glu с синаптическими мембранами гиппокампа человека в сравнении с NMDA показало, что оба соединения ингибируют ее связывание с примерно одинаковыми константами. Добавление в инкубационную среду глицина не влияло на параметры связывания ^3H -L-Glu, но усиливало ингибирующее действие NMDA и PhGA. Эти данные также свидетельствуют об избирательности взаимодействия этого соединения с NMDA рецепторами [Корешонков и др., 1995].

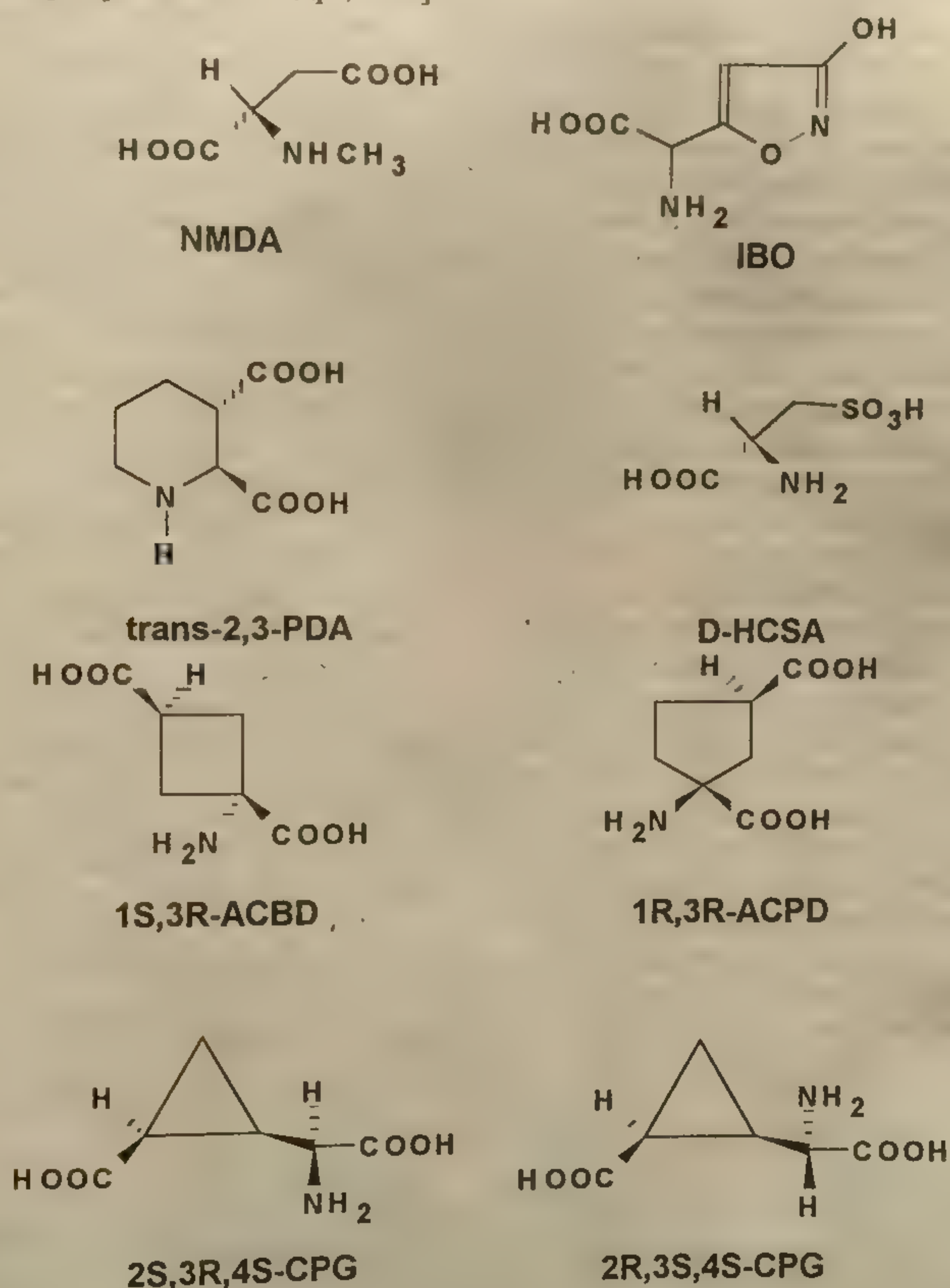


Рис. 2.1. Агонисты глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора

В опытах *in vivo* это соединение предупреждает судороги, вызываемые ВАК. Анализ его противосудорожного действия показал, что оно дозозависимо

подавляет судороги, вызываемые NMDA, и превосходит по силе действия γ -DGG. Против каинат-индуцированных судорог PhGA действует слабо и только в максимальных дозах (1.0 мкмоль) [Гаряев и др., 1990].

Из сравнения данных биологического действия PhGA *in vivo* и *in vitro* можно сделать вывод, что она является частичным агонистом. "Внутренняя активность" этого соединения невелика, поэтому при интрацеребровентрикулярном введении мышам его высокой дозы (1 мкмоль) судорожный ответ не возникает. Обладая практически таким же сродством к рецептору, что и NMDA, трикислота PhGA в экспериментах *in vivo* способна блокировать ее действие, так как концентрация последней в этих опытах на три порядка ниже.

Особенности строения антагонистов. Важной вехой в изучении ВАРгической передачи стало открытие конкурентного NMDA антагонистического действия 2-амино- ω -фосфонокарбоновых кислот. Среди лигандов различных рецепторов ВАР на сегодняшний день этот класс соединений наиболее обширен. Он включает в себя дикарбоновые аминокислоты, пептиды, производные фосфоновой кислоты и циклические соединения. Наиболее известными конкурентными антагонистами NMDA рецепторов являются D-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота (D-AP5), D-2-амино-7-фосфогептановая кислота (D-AP7), β -D-аспартиламинотетракарбоновая кислота (GAMS) и другие [Johnson, Koerner, 1988]. Эти соединения конкурентно ингибируют связывание меченых лигандов NMDA рецепторов с мембранами мозга и устраняют NMDA-индуцированную деполяризацию спинальных мотонейронов, но не влияют на возбуждение нейронов, вызванное каинатом, квисквалатом или AMPA. NMDA-антагонисты, содержащие остаток фосфоновой кислоты, оказались очень эффективными средствами экспериментального исследования рецепторов ВАР, однако их применение ограничено в основном моделями *in vitro* и опытами с интрацеребральным введением из-за плохого проникновения этих соединений через ГЭБ. Тем не менее перспективность использования конкурентных антагонистов NMDA рецепторов в качестве противосудорожных и церебропротективных препаратов послужила стимулом для многих групп исследователей в поиске новых соединений подобного типа действия, способных проникать через ГЭБ. Например, (+/-)-3-карбокси-5-фосфо-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (SC-48981), который может рассматриваться как жесткий аналог AP5, по мнению авторов представляет собой пример активного при системном введении конкурентного антагониста NMDA рецепторов с длительным действием [Vasquez et al., 1992].

Следует отметить попытки замены полярной фосфоновой кислотной группы на ее биоизостеры, например на кислый гетероцикл тетразол. В первую очередь речь идет о цис-4-(2H-тетразол-5-илметил)пиперидин-2-карбоновой кислоте (LY 233053) [Ornstein et al., 1991]. По данным этих авторов, такая замена привела, наряду с сохранением NMDA антагонистической активности, к укорочению времени действия вещества. По их мнению, препараты с таким сочетанием свойств могут иметь определенные перспективы клинического применения.

При рассмотрении агонистов NMDA рецепторов мы упоминали N-фаламоил-L-глутаминовую кислоту как пример "суперкислого" агониста. Недавно появилась работа, в которой описаны NMDA антагонистические свойства двух природных аминокислот - (2R,1'R)- и (2R,1'S)-2-амино-3-(1,2-дикарбоксиэтилтио)пропионовых кислот, выделенных из *Amanita pantherina* [Fushiya et al., 1993]. Антагонистические свойства этих двух аминокислот определялись на нескольких моделях, в том числе радиолигандным анализом и в электрофизиологических экспериментах. Как и PhGA, эти аминокислоты также содержат в молекуле три кислотные группы, но, в отличие от PhGA, имеют и свободную аминогруппу. Правда, встает вопрос, можно

ли называть эти соединения, по аналогии с PhGA, "суперкислыми" антагонистами, или две дистальные карбоксильные группы в этих молекулах биоизостерны двухзаряженной фосфоновой группе.

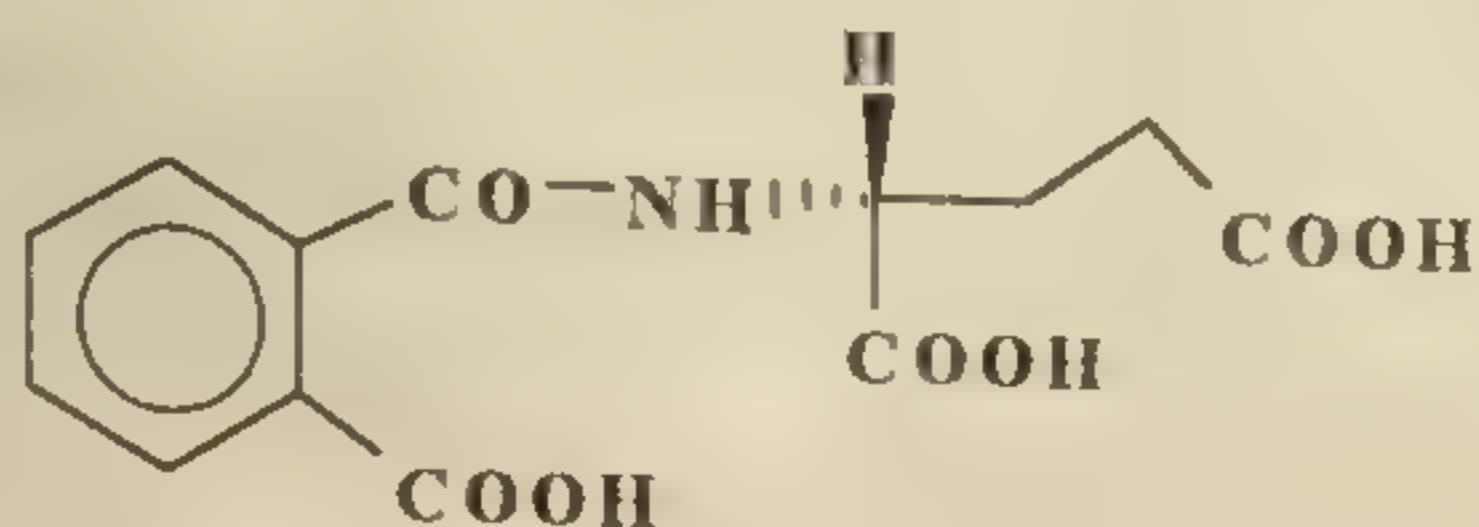


Рис.2.2. N-фталамоил-L-глутаминовая кислота (PhGA)

В настоящее время активно синтезируется и изучается уже третье поколение конкурентных антагонистов NMDA рецепторов. К первому поколению относятся DL-AP5, DL-AP7 и их D-изомеры. Ко второму - DL-3-(2-карбоксипиперазин-4-ил)пропил-1-фосфоновая кислота (CPP), DL-3-(2-карбоксипиперазин-4-ил)проп-1-ен-1-фосфоновая кислота (CPPene), DL-цис-4-фосфометилпиперидин-2-карбоновая кислота (CGS19755), 2-амино-4-метил-5-фосфопент-3-енкарбоновая кислота (CGS37849), 2-амино-4,5-(1,2-циклогексил)-7-фосфогептановая кислота (NPC12626) и 3-карбокси-5-фосфо-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (SC46981). Третье поколение - оптические изомеры антагонистов второго поколения D-CPP, D-CPPene, cis-CGS19755 и (2R)-CGS37849. К третьему же поколению следует отнести и соединение NPC 17742 [2R,4R,5S-2-амино-4,5-(1,2-циклогексил)-7-фосфогептановая кислота] [Ferkany et al., 1993].

Основные закономерности связи химической структуры с биологической активностью в ряду антагонистов NMDA рецепторов сводятся к следующему: относительно длинная цепочка, соединяющая терминальные кислотные функции (четыре-шесть атомов); предпочтительность замещения атома азота аминогруппы; D-конфигурация хирального центра. Выраженность антагонистической активности зависит от природы ω -кислотной функции и в отличие от агонистов возрастает в ряду $\text{COOH} > \text{SO}_3\text{H} > \text{PO}_3\text{H}_2$ [Пиотровский, 1987].

Глициновый сайт. Еще несколько лет назад глицин, как и ГАМК, считался основным тормозным медиатором в ЦНС человека и животных, ингибирующее действие которого связывали со специфическими глициновыми рецепторами, конкурентно и селективно блокируемыми стрихнином и открывающими хлорный канал в синаптической мембране [Раевский, Георгиев, 1976]. Никто не предполагал его тесной связи с системой возбуждения в ЦНС. В своей классической статье в 1960 году Curtis и Watkins как раз и разделяли аминокислоты на возбуждающие и тормозные, относя к первым дикарбоновые аминокислоты - аспарагиновую, глутаминовую и их аналоги, а ко вторым - продукты их α -декарбоксилирования - β -аланин, γ -аминомасляную кислоту и их аналоги, в том числе и глицин. Однако в конце 80-х годов лавинообразно стало возрастать число работ, в которых доказывалось участие глицина в положительной регуляции NMDA-рецепторов. Результатом этих исследований явилось доказательство существования в NMDA-рецепторно-ионофорном комплексе специфического сайта, способного связывать глицин [Thomson, 1990; Wong, Kemp, 1991].

Первые факты, которые не вписывались в традиционную концепцию тормозного медиатора, появились в работах, рассмотревших глицин как тормозного медиатора, появились в работах, посвященных сравнительному изучению анатомической локализации мест

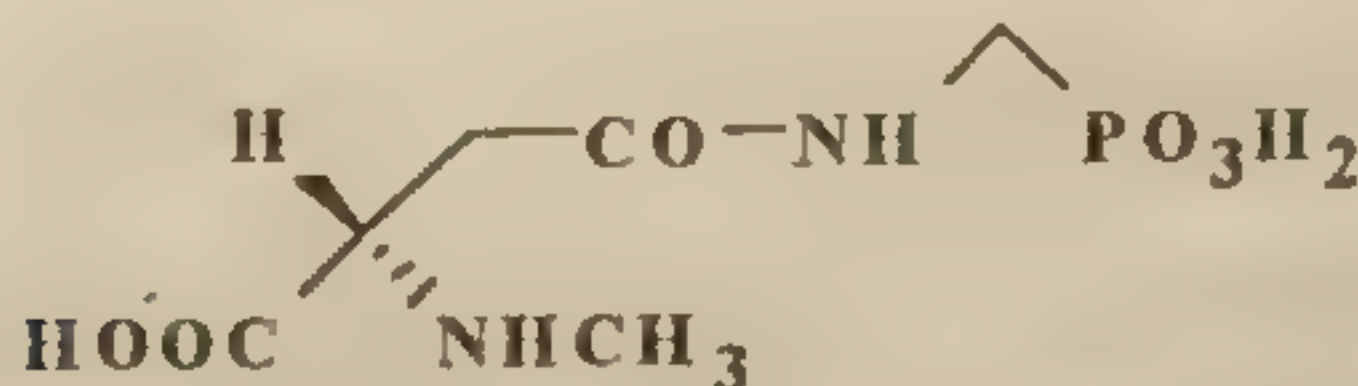
специфического связывания ^3H -глицина и ^3H -стрихнина в ЦНС млекопитающих [Bristow et al., 1986]. Оказалось, что с помощью меченого стрихнина



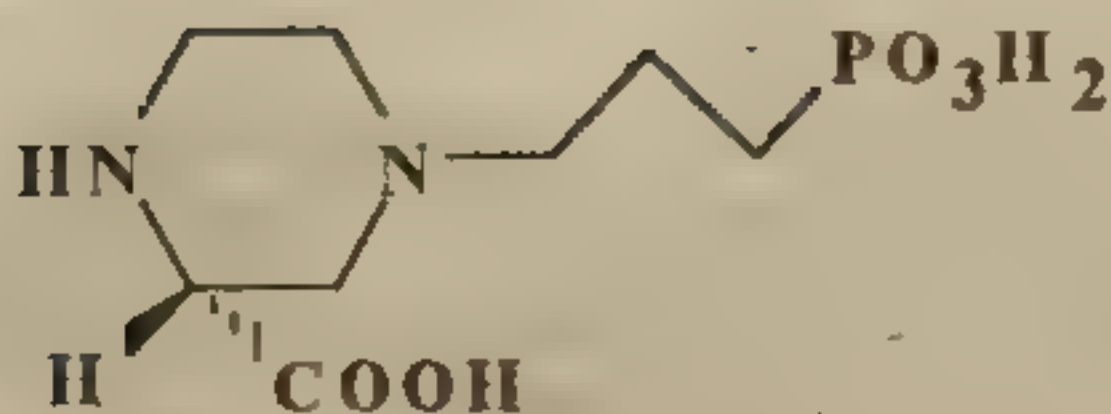
D-AP5



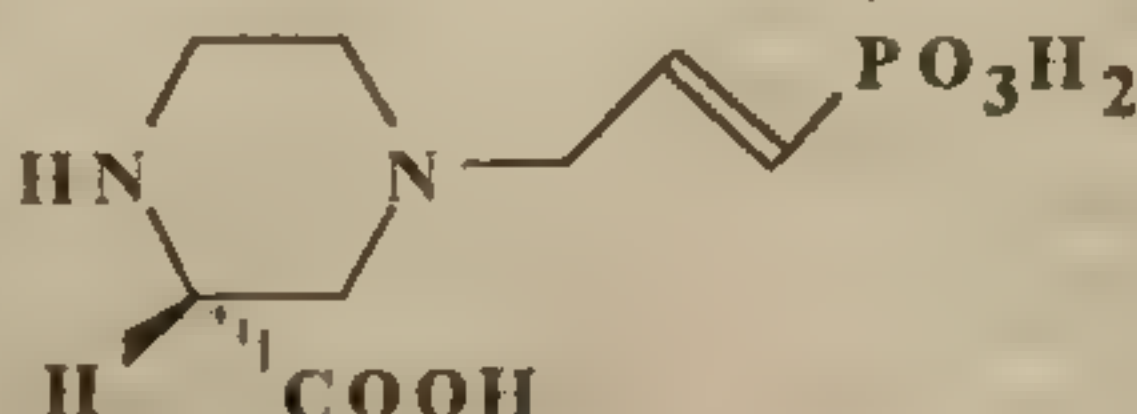
D-AP7



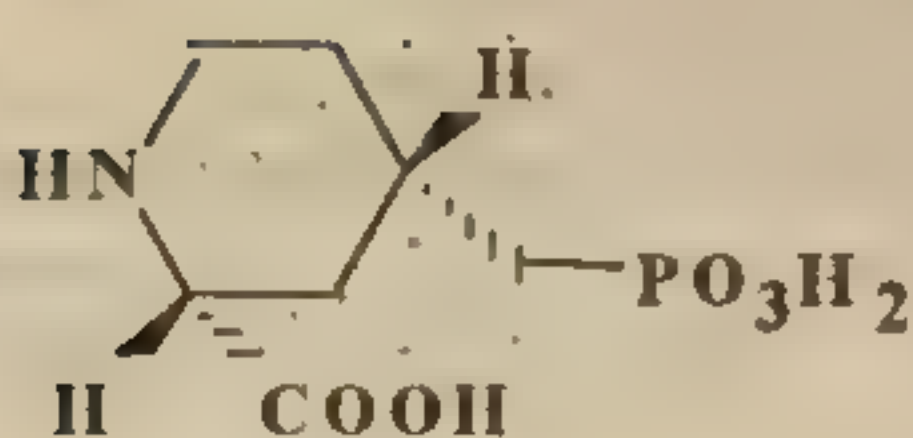
D-GAMP



D-CPP



D-CPPene



CGS 19755



CGS 37849

Рис. 2.3. Антагонисты глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора

идентифицируются рецепторы только задних отделов головного мозга и спинного мозга, в то время как радиоактивная метка, включенная в сам глицин, обнаруживается также в отделах переднего мозга, что указывает на наличие в этих структурах высокоаффинных мест связывания глицина. Это позволило предположить, что в переднем мозге существует большая популяция стрихнин-нечувствительных глицин-связывающих сайтов с неизвестной в то время функцией. Корреляция локализации этих мест связывания в переднем мозге с локализацией еще одного известного рецепторного комплекса - а именно N-метил-D-аспаратного, натолкнула исследователей на мысль о том, что такое совпадение не случайно, и между этими двумя сайтами существует определенная взаимосвязь [Monaghan, Cotman, 1985; Cotman et al., 1987]. Окончательные доказательства были представлены в работе Johnson и Ascher [1988], которые первыми сообщили о способности глицина в субмикромольных концентрациях усиливать NMDA-вызванные ответы нейронов в культуре тканей. Поначалу ими было отмечено, что величина NMDA-индуцированных токов в нейронах уменьшалась в двух случаях: при удалении изолированных нервных клеток от

материнской колонии и при увеличении скорости перфузии культуры. Авторы предположили, что культуральная ткань выделяет неизвестное вещество, потенцирующее NMDA-ответы. Это вещество быстро удаляется или распадается в указанных выше двух ситуациях. После испытаний большого набора соединений, содержащихся в культуральной среде, было установлено, что этим "неизвестным" веществом, усиливающим NMDA-индуцированные токи, является не что иное, как простейшая аминокислота - глицин. Этот эффект глицина проявляется в низких концентрациях (EC_{50} 100-300 нМ), что примерно в десять раз меньше, чем требуется для активации тормозного, стрихнин-чувствительного, рецептора [Wong, Kemp, 1991].

В дальнейшем аналогичные результаты были получены в опытах с гиппокампальными нейронами [Akaike et al., 1988], с гранулярными клетками мозжечка [Nemeth, Parks, 1989], нейронами стриатума [Ransom, Deschenes, 1988], а также на других экспериментальных моделях.

После того, как факт потенцирования глицином NMDA-индуцированного синаптического возбуждения уже не вызывал сомнений, среди специалистов развернулась дискуссия о том, является ли глицин аллостерическим модулятором NMDA-рецептора или его коагонистом, и какова значимость глицина для возникновения глутаматных возбуждающих ответов в физиологических условиях. Еще в ранних работах, в частности Kessler et al., [1989], было показано, что конкурентный антагонист глицинового сайта - кинуреновая кислота, блокирует ответы нейронов на аппликацию NMDA в культуральной среде, не содержащей глицина.

Пожалуй, только Kleckner et al. [1988] удалось получить четкие доказательства того, что активация глициновых сайтов является абсолютно необходимым условием для нормального функционирования NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса, и аргументировать гипотезу о глицине как коагонисте рецепторов ВАР NMDA типа. В их экспериментах в ооциты *Xenopus* вводилась матричная РНК из первичной культуры мозга крысы, и в результате экспрессии генетического материала была получена возможность изучения процесса активации NMDA-рецепторов в среде, лишенной глицина. Оказалось, что на этой модели NMDA-индуцированные ответы возникали только при добавлении в среду глицина.

Это и явилось решающим доказательством того, что глицин является коагонистом для NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса, то есть для открытия ионного канала требуется связывание соответствующих агонистов как с глутамат-, так и глицин-узнающими сайтами.

Эксперименты с избирательными антагонистами глицинового сайта также подтвердили этот вывод. Одним из таких соединений является естественный метаболит триптофана - кинуреновая кислота (4-гидроксихинолин-2-карбоновая кислота). Она синтезируется в глиальных клетках и содержится в большом количестве в нервной ткани [Turski et al., 1987]. Известно, что кинуреновая кислота, антагонист рецепторов ВАР широкого спектра действия, обладает свойствами неконкурентного антагониста NMDA рецепторов [Kemp et al., 1987; Evans et al., 1987]. Однако, было обнаружено, что она конкурентно ингибирует стрихнин-нечувствительное связывание 3H -глицина с мембранами изюга крыс [Kessler et al., 1989], а NMDA-блокирующее действие кинуреновой кислоты на срезах мозга может сниматься глицином, что указывает на ее антагонизм с глициновым сайтом [Watson et al. 1988]. Блокада кинуренатом NMDA-индуцированных ответов снимается добавлением глицина или D-серина, в то время как блокада ответов на агонисты АМРА-рецепторов под действием кинурената глицином не ослабляется

[Monaghan et al., 1989]. Аналогичные данные были получены и в экспериментах с 7-хлоркинуреновой кислотой [Kemp et al., 1988; Wong, Kemp, 1991].

Раскрытию механизмов взаимосвязи глутамат- и глицин-связывающих сайтов NMDA-рецептора помогли данные по изменению связывания антагонистов NMDA-рецепторов в присутствии лигандов глицинового сайта. Глицин и D-серин повышали аффинитет ^3H -глутаматсвязывающих рецепторных сайтов, более чувствительных к антагонистам [Monaghan et al., 1988]. Глициновые агонисты уменьшали связывание AP5 и CPP с NMDA-рецепторами. Частичные антагонисты глициновых участков HA-966 и ACBC повышали связывание CPP с NMDA-рецепторами в несколько раз [Lanthorn, 1994], причем эти эффекты устранялись при добавлении в среду глицина, D- или L-серина. В нескольких работах показано, что такие антагонисты, как AP5, CPP и CGS-19755, уменьшают связывание глицина, тогда как агонисты на него не влияют [Kessler et al., 1989; Hood et al., 1990]. Иную картину можно наблюдать при изучении влияния глициновых антагонистов на связывание лигандов рецепторов ВАР: 7-хлоркинуреновая кислота и HA-966 уменьшали специфическое связывание глутамата с мембранами мозга [Danysz et al., 1994].

Глицин и его аналоги могут усиливать нейротрансдукцию, опосредованную NMDA-рецепторами, в мозговой ткани *in vivo*. Было установлено, что D-серин усиливал возбуждение нейронов, индуцированное микроионофоретическим подведением NMDA, в таламусе или в красном ядре [Sault, 1989]. Глицин также потенцировал NMDA-вызванное выделение цГМФ из клеток мозжечка крыс [Danysz et al., 1989]. Однако в других опытах *in vivo* и на срезах взрослой ткани не удалось показать потенцирующий эффект самого глицина на NMDA-индуцированные ответы [Kemp et al., 1988; Watson et al., 1988; Fletcher, Lodge, 1988]. Эти результаты указывают, что в нормальных условиях, вероятно, концентрация глицина вполне достаточна для полной активации глицинового сайта. Однако вполне возможна и другая ситуация - NMDA вызывает выброс глицина из нейронов или глиии до уровня, насыщающего глициновый сайт [Wong, Kemp, 1991].

Глутамат- и глицин-узнающие сайты NMDA рецепторно-канального комплекса аллостерически влияют друг на друга, при этом изменяется внутренняя активность агониста, а не его аффинность. Частичный агонист, занимая один из узнающих сайтов, вызывает такие конформационные изменения всего рецепторного комплекса, которые приводят к увеличению скорости образования комплекса второго коагониста с рецептором [Grimwood et al., 1993; Lester et al., 1993; Priestley, Kemp, 1994].

Учитывая интерес химиков и фармакологов к веществам, способным взаимодействовать с глициновым сайтом NMDA-рецептора, остановимся на соединениях, являющихся его агонистами, частичными агонистами и конкурентными антагонистами. Подчеркнем еще раз, что речь идет о стрихнин-нечувствительных сайтах специфического связывания глицина, входящих в состав NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса.

При анализе сведений о сравнительной силе агонистов и антагонистов следует учитывать определенное расхождение данных, связанное с различием экспериментальных моделей. Например, в электрофизиологических опытах было показано, что агонистическая активность убывает у глицина и родственных ему соединений в следующем ряду: глицин > D-серин > D-аланин > β -аланин > β -фтораланин > D-циclosерин (D-CS) > L-серин > L-аланин [Chizhnikov et al., 1990], а максимальную активность, причем превосходящую глицин, проявляет 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (ACPrC). Несколько отличные от вышеприведенного ряда были получены в результате

радиолигандного анализа: глицин > D-серин > D-аланин > D-CS > L-аланин > L-серин > L-CS > γ -D-глутамилглицин > метиловый эфир глицина [Monaghan et al., 1989]; и при определении связывания ^3H -ТСР (в присутствии агонистов NMDA-рецепторов): глицин > D-серин > D-аланин > D-CS > L-аланин > L-серин. Можно особо выделить очень интересную работу McBain et al. [1989], в которой авторы, изучив свыше 60 структурных аналогов глицина и других соединений, выделили следующие основные закономерности зависимости биологической активности от химической структуры для агонистов глициновых сайтов:

1) Все активные соединения содержат α -аминокислотную группировку. Поскольку в физиологических условиях, при pH близком к 7, эта группировка существует в виде цвиттериона, можно предположить, что в узнающем месте рецептора существуют один положительно и один отрицательно заряженные центры (хотя лиганд может образовывать с рецептором не только ионные связи).

2) Решающее значение для проявления активности имеет расстояние между амино- и карбоксильной группами - оптимальной является их расположение при одном и том же атоме углерода. Введение между ними еще одного атома углерода (β -аланин) приводит к резкому падению агонистической активности.

3) Если α -углеродный атом хиральный, то для проявления агонистической активности предпочтительной является D-конфигурация.

4) Агонисты глицинового сайта можно разделить на две группы: соединения, не содержащие в молекуле заместители, способные к образованию водородной связи, и вещества, содержащие такие заместители. К первой группе относятся глицин, аланин и АСРГС, в молекулах которых α -углеродный атом или не имеет заместителя, или этот заместитель представляет собой гидрофобную группу. Во вторую группу входят D-серин и его аналоги с гидрофильными заместителями, способными выступать в роли акцептора протона при образовании водородной связи. Вероятно, образование водородной связи между молекулой лиганда и функциональными группами в узнающем сайте настолько способствует связыванию, что даже нивелирует отрицательное влияние стерических эффектов объемных заместителей.

При рассмотрении антагонистов глицинового сайта прежде всего остановимся на одном соединении - НА-966 (3-амино-1-гидрокси-2-пирролидон). Его антагонистическое действие на ВАКергическую передачу было обнаружено сравнительно давно [Wong, Kemp, 1991]. Однако только недавно было показано, что блокада NMDA-индуцированных ответов под действие НА-966 зависит от наличия в среде глицина, то есть НА-966 является конкурентным антагонистом глициновых сайтов NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса [Drejer et al., 1989]. Однако работы по разделению этого хирального соединения на стереоизомеры показали, что в действительности R-(+)-НА-966 является частичным агонистом [Williams et al., 1989; Kemp, Leeson, 1993].

Среди антагонистов глициновых сайтов можно выделить несколько групп гетероциклических, полициклических и алициклических соединений: производные хиноксалиндионов, индол-2-карбоновой кислоты, 4-гидроксихинолина, пирролидона, циклобутана и цикlopentана. На рис.2.4 приведены структурные формулы основных агонистов и антагонистов глициновых сайтов NMDA-рецептора.

Достаточно сильными антагонистами этого сайта являются также циклолейцин (1-аминоциклопентанкарбоновая кислота, АСРС) и 1-аминоциклобутанкарбоновая (АСВС) кислота, причем эти соединения ингибируют связывание глицина только с NMDA-рецепторно-ионофорным комплексом, но не со стрихнин-чувствительными глициновыми рецепторами. Интересно отметить близкое структурное сходство

этих соединений с 1-аминоциклопропанкарбоновой кислотой (ACPrC), которая является высокоактивным агонистом этих сайтов. Такое изменение направленности действия при увеличении гидрофильности молекулы может свидетельствовать о большом значении взаимодействия этих соединений с липидами мембран - увеличение способности соединения к взаимодействию с липидной фазой существенно меняет психотропные свойства аналогов моно- и дикарбоновых кислот [Петров и др., 1995].

Иногда в экспериментах для блокады глицинового сайта NMDA-рецептора используют два производных хиноксалиндиона - CNQX и DNQX [Birch et al., 1988], однако их применение в опытах *in vivo*, при высокой концентрации глицина в среде, и способности проявлять антагонистические свойства по отношению к другим типам рецепторов ВАР (AMPA и кайнатным) ограничено. В ряду производных хиноксалиндиона сродство к глициновому сайту резко возрастает при увеличении числа заместителей в бензольном кольце. Так, избирательность взаимодействия тризамещенного производного ACEA-1201 с глициновым сайтом на три порядка выше, чем с AMPA рецептором [Leeson, Iversen, 1994].

В работе Leeson et al. [1991] изучена связь химической структуры с биологической активностью в ряду производных и аналогов кинуреновой кислоты. Показано, что усиление блокирующего действия глицинового сайта происходит при введении заместителей в положения 5, 7 и 5,7 кинуреновой кислоты. Оптимальным оказалось 5-иод-7-хлорпроизводное - наиболее сильный и селективный антагонист глицинового сайта NMDA рецептора. Замещение в положения 1 и 6 приводило к соединениям, проявлявшим неNMDA антагонистическую активность, а 8-замещенные производные не действовали ни на один из типов рецепторов ВАР. Изучение активности аналогов кинуреновой кислоты показало, что необходимым условием проявления требуемой активности является наличие атома кислорода в положении 4, причем в оксо-таутомерной форме. На основании полученных данных авторы предложили модель связывания с глициновым сайтом производных кинуреновой кислоты, включающую в себя а) относительно небольшую по размеру гидрофобную область для связывания бензольного цикла, б) донорную группу, образующую водородную связь с оксо-группой в положении 4, в) акцепторную группу, образующую водородную связь с амино-группой в положении 1, г) полярную группу, образующую ионную связь с карбоксильной группой в положении 2. В дальнейшем авторы уточнили свою модель, показав при исследовании биологической активности серии производных 4-амидо-2-карбокситетрагидрохинолинов наличие в рецепторе объемной гидрофобной области рядом с местом связывания полярной группы в положении 4 антагониста [Leeson et al., 1992].

В работе Monaghan et al. [1988] высказывается предположение, что NMDA рецепторы существуют в двух конформационных состояниях - агонист-предпочитающее и антагонист-предпочитающее. Роль глицина как коагониста заключается в том, что он превращает антагонист-предпочитающую конформацию рецептора в агонист-предпочитающую. Предполагается, что и кинуреновая кислота сдвигает равновесие в сторону увеличения доли глицин-предпочитающей конформации [Chizhnikov et al., 1990].

Заклячая раздел о роли глицина в функционировании NMDA-рецепторного комплекса в нейронах ЦНС следует подчеркнуть, что участие глицина является необходимым условием активации рецепторного комплекса, то есть он играет роль коагониста. Поэтому глицин-связывающий сайт является еще одной структурой NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса, через который возможна его фармакологическая регуляция. Необходимо отметить, что в связи с трудностями.

встретившимися на пути внедрения в клинику конкурентных агонистов глутамат-связывающего сайта [см., например, Sveinbjornsdottir, 1993], соединения, влияющие на глициновый сайт, особенно его частичные агонисты, начинают привлекать все большее внимание.

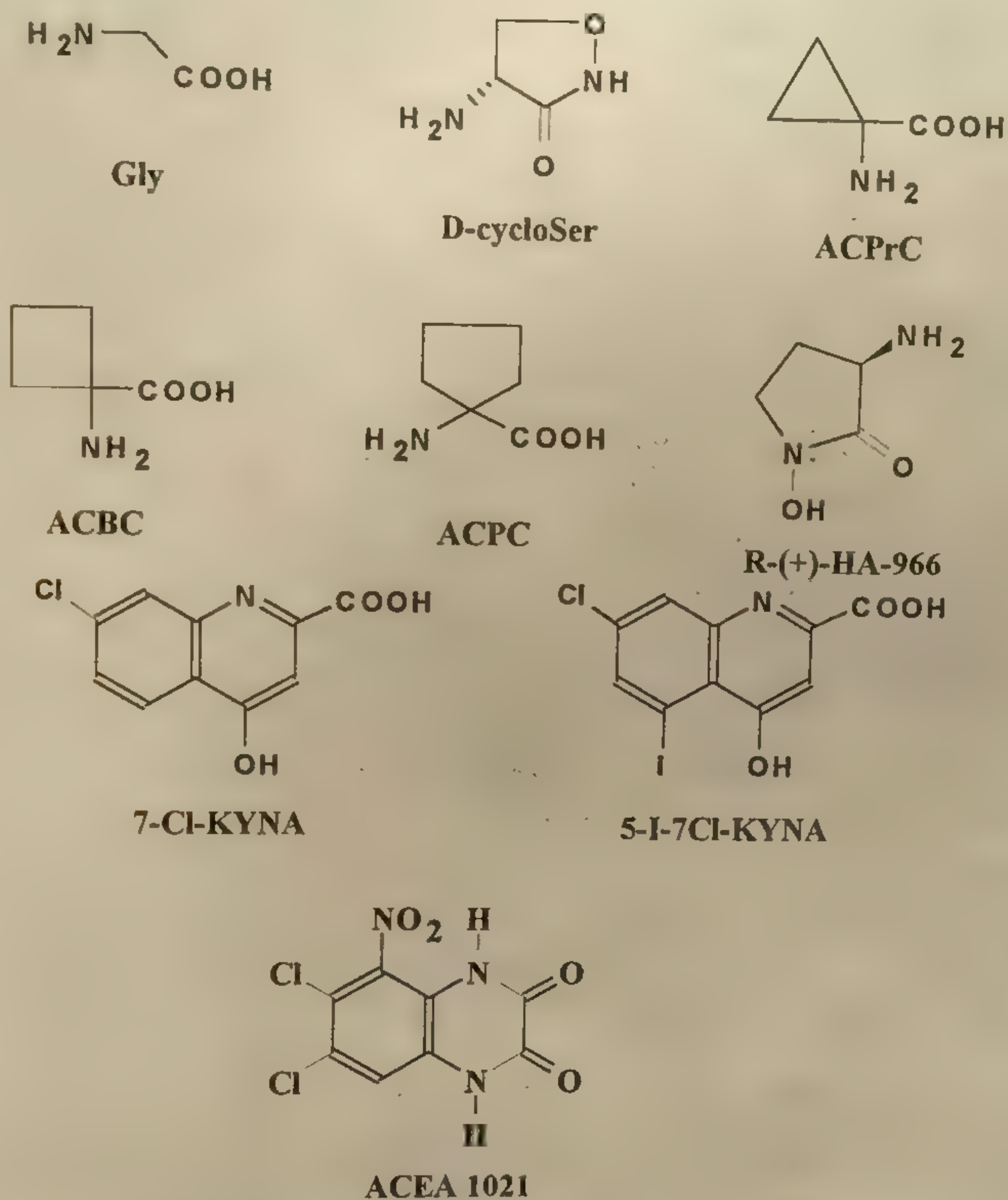


Рис. 2.4. Агонисты и антагонисты глицин-связывающего сайта NMDA рецептора

Свойства ионного канала, сопряженного с NMDA-рецептором. Стимуляция NMDA рецепторов агонистами приводит к деполяризации нейронов, что связано с "открыванием" сопряженных с рецептором Na^+ и K^+ -каналов. Помимо одновалентных ионов, большую роль в NMDA-индуцированной деполяризации играют ионы кальция, которые после связывания агониста с NMDA-рецептором входят внутрь клетки по каналам, отличным от потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [Mayer et al., 1987]. Подобный же эффект был отмечен и для двухвалентных ионов

Ba^{2+} и Cd^{2+} , в то время как ионы Co^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} не проникали через этот канал. Это позволило выдвинуть гипотезу о зависимости проникновения ионов (одно- и двухвалентных) через канал, ассоциированный с NMDA-рецептором, от способности этих катионов терять гидратную оболочку [Ascher, Nowak, 1988]. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} при стимуляции NMDA-рецепторов может лежать в основе как NMDA-индуцированной синаптической пластичности нервных клеток [Lynch et al., 1983], так и гибели нейронов при гипервозбуждении, вызванном высвобождением эндогенных или введением экзогенных дикарбоновых кислот [Rothman, Olney, 1986]. Проницаемостью для ионов кальция обладают многие рецепторные каналы, в частности рецептора АТФ и никотинового холинорецептора, однако канал NMDA рецептора пропускает в 2-3 раза больше ионов кальция [Rogers, Dani, 1995].

Важной особенностью NMDA-рецепторов, отличающей их от других типов рецепторов ВАР, являются потенциал-зависимые свойства их ионного канала, которые впервые были обнаружены при аппликации агонистов NMDA-рецепторов к двигательным нейронам спинного мозга кошки. При обычном потенциале покоя мембраны (-70-80 мВ) NMDA-активируемые входящие токи практически не регистрируются, однако при повышении потенциала до -30 мВ они значительно возрастают и достигают максимума при мембранном потенциале от -30 до -20 мВ, снижаясь при дальнейшей деполяризации до 0 мВ [Flatman et al., 1983].

NMDA-рецепторный канал представляет собой "singly-occupied channel", то есть в каждый момент времени только один катион занимает место (или места) в области около поры канала. При этом локальный заряд в (или около) поры не вызывает появления на окружающей поверхности значительного потенциала, способного влиять на ионную проницаемость. Это означает, что механизм высокой ионной проницаемости канала NMDA рецепторов для ионов кальция отличен от такового для потенциал-зависимых кальциевых каналов, в которых существуют два высокоаффинных связывающих сайта, которые и обеспечивают высокую проницаемость для ионов кальция [Zarei, Dani, 1994].

Следует еще раз подчеркнуть, что ионный канал, сопряженный с NMDA-рецептором, отличается от трансмембранных каналов, открывающихся при активации других рецепторов в центральной и периферической нервных системах. Ионные процессы, сопровождающие стимуляцию NMDA-рецептора, являются уникальными [Ascher, 1988]. Рассмотрим теперь подробнее регуляцию и свойства канала, сопряженного с NMDA рецептором.

Модуляция свойств канала двухвалентными катионами. Важную роль в регулировании функций NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса играют двухвалентные катионы. Потенциал-зависимые свойства канала, ассоциированного с NMDA-рецепторным комплексом, определяются в первую очередь ионом Mg^{2+} . Впервые эта идея была высказана при обнаружении ингибирующего действия ионов Mg^{2+} на деполяризацию нейронов спинного мозга, вызываемую агонистами NMDA-рецепторов [Ault et al., 1980]. В дальнейших исследованиях, с использованием метода patch-clamp, был установлен неконкурентный и потенциал-зависимый характер торможения ионами Mg^{2+} синаптического возбуждения [Ascher et al., 1988]. Ионы Mg^{2+} могут вызывать потенциал-зависимую блокаду канала, находясь не только с наружной стороны клеточной мембраны, но и с ее внутренней стороны. При этом внутриклеточный магний уменьшает величину выходного тока при положительных потенциалах [Nowak et al., 1984].

Этот феномен имеет место при концентрации ионов Mg^{2+} в среде около 1мМ, что соответствует их физиологической концентрации во внеклеточной среде. В этих условиях высокочастотная стимуляция пресинаптического входа может "пробить" магниевый блок NMDA-канала и вызвать деполяризацию пресинаптической мембраны [Collingridge et al., 1988]. Торможение синаптической передачи через NMDA рецепторы ионами Mg^{2+} можно зафиксировать не только на электрофизиологических моделях, но и при изучении биохимических сдвигов, происходящих в нейронах при деполяризации мембраны. В исследованиях на культуре нервной ткани установлено, что Mg^{2+} устраняет индуцированные агонистами NMDA типа изменения концентрации внутриклеточных "посредников" проведения нервного импульса: тормозит вход ионов Ca^{2+} , образование цГМФ и выделение арахидоновой кислоты [Murphy et al., 1987; Novelli et al., 1987].

Ингибирующее действие ионов Mg^{2+} на процессы синаптического возбуждения избирательно проявляется при активации рецепторов ВАР только NMDA типа, но не AMPA или каинатного типов. Поэтому Mayer и Westbrook [1987] предположили, что в канале NMDA рецептора существует участок специфического связывания этих ионов, который чувствителен к изменению трансмембранного потенциала, причем сродство этого участка к ионам магния (и, соответственно, способность Mg^{2+} блокировать ионный канал) повышается при гиперполяризации.

Важную роль ионов Mg^{2+} подчеркивают не только электрофизиологические и биохимические данные, но и результаты радиолигандного анализа. Хотя ионы Mg^{2+} не влияют на специфическое связывание 3H -глутаминовой кислоты, они способны модулировать связывание агонистов других специфических сайтов, входящих в состав NMDA-рецепторов - фенциклидиновых и глициновых. В частности, у ионов Mg^{2+} отмечался двухфазный эффект на связывание лигандов фенциклидинового сайта: в малой концентрации (до 300 мкМ) они усиливали связывание 3H -ТСР и 3H -МК-801, в то время как в высоких концентрациях (около 1мМ) они это связывание ингибировали [Ferkany, 1986]. Тормозный эффект ионов Mg^{2+} объясняется их связыванием со специфическим сайтом, расположенном в канале, в результате чего и блокируется синаптическая передача, а стимулирующее действие в малых концентрациях - взаимодействием с дополнительными сайтами связывания. Добавление глутамата усиливает модулирующее действие Mg^{2+} на связывание лигандов фенциклидинового сайта и 3H -глицина [Marvizon, Skolnick, 1988]. Показано, что места связывания МК-801 и ионов магния в NMDA-рецепторном канале перекрываются [Mori et al., 1992]. Таким образом, ионы магния, связываясь со специфическими сайтами в канале NMDA-рецептора, способны не только модулировать проводимость канала, но и вызывать конформационные изменения всего NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса.

Таким образом, можно сделать вывод, что на уровне синапса суммарный ответ при стимуляции NMDA-ергического синапса зависит не только от количества медиатора, выделившегося из пресинаптической мембраны, но и от величины исходного потенциала постсинаптической мембраны, который, в свою очередь, определяется ионами Mg^{2+} .

В регуляции функционирования NMDA-рецептора, помимо ионов Mg^{2+} , участвуют также ионы Zn^{2+} . В частности, в системе центральных нейронов добавление ионов Zn^{2+} уменьшает вызванные агонистами NMDA-рецепторов деполяризацию мембраны нервных клеток и нейротоксические изменения, но не влияет на подобные процессы, индуцированные каинатом или квисквалатом [Koh, Choi, 1988]. Детальные исследования ингибирования ионами Zn^{2+} NMDA-индуцированных ответов гиппокампальных нейронов показали, что эти ионы

неконкурентно тормозят нейрональное возбуждение, причем это торможение, в отличие от вызванного ионами магния, не зависит от исходного потенциала постсинаптической мембраны.

Это позволяет говорить о различных механизмах регуляции NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса ионами Zn^{2+} и Mg^{2+} . Ионы Zn^{2+} оказывают сильное ингибирующее действие на связывание 3H -МК-801 и, подобно конкурентному антагонисту AP5, ослабляют потенцирующий эффект глутамата [Reynolds, 1990]. В отличие от ионов магния, они уменьшают специфическое связывание 3H -глутамата и 3H -аспартата с мембранами гиппокампальных клеток [Slevin, Kasarkis, 1985], что также свидетельствует о том, что точка приложения модулирующего действия ионов Zn^{2+} на NMDA-рецепторный комплекс находится вблизи (или тесно связана аллостерически) от участка связывания медиатора. Однако остается еще много нерешенных вопросов, особенно касающихся роли ионов Zn^{2+} в регуляции возбуждающей синаптической передачи в физиологических условиях. Можно привести любопытные данные о том, что в головном мозге максимальная концентрация ионов цинка обнаружена в гиппокампе [Donaldson et al., 1973], структуре, наиболее богатой ВАКергическими терминалями, при деполяризации которых происходит высвобождение ионов Zn^{2+} в пресинаптическое пространство [Aniksztejn et al., 1991].

В заключение этого раздела следует отметить, что регуляция NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса двухвалентными ионами имеет большое значение в функционировании возбуждающей синаптической передачи, однако пока что не представляет большого интереса с точки зрения прикладной фармакологии.

Канальный сайт связывания неконкурентных антагонистов (фенциклидиновый).
История изучения неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов началась с любопытного наблюдения группы английских исследователей, что так называемые "диссоциативные" анестетики, кетамин и фенциклидин, селективно блокируют возбуждение нейронов, вызванное NMDA [Anis et al., 1983].

Известные еще с середины 50-х годов, кетамин и фенциклидин (PCP) оказывают сильное анальгетическое действие, сопровождающееся слабой мышечной релаксацией и относительной сохранностью многих защитных рефлексов [Wilmot, 1989]. Необычные эффекты этих препаратов на изменение соматомоторных функций и вызвали появление термина "диссоциативные анестетики". Было установлено, что кетамин в значительной степени нарушает полисинаптические рефлексы и слабо - моносинаптические, практически не влияя на процессы торможения в ЦНС нервной системе [Tang, Schroeder, 1973]. Поскольку ранее было известно, что кетамин не изменяет процессы высвобождения и обратного захвата медиаторных аминокислот в нервной ткани [Ferkany, 1986], то в указанной работе Anis и соавт. [1983] была проверена гипотеза о постсинаптическом действии фенциклидина и кетамина, точнее их способность блокировать синаптическое возбуждение нейронов. У децеребрированных или наркотизированных пентобарбиталом кошек и крыс изучалось влияние обоих диссоциативных анестетиков на ответы спинальных нейронов при электрофоретическом подведении к ним агонистов рецепторов ВАК и ацетилхолина. Эти опыты показали, что кетамин и фенциклидин селективно ингибировали процессы возбуждения нейронов задних рогов спинного мозга, вызванные аппликацией NMDA и практически не влияли на квисквалат- и каинат-индуцированные эффекты. При тестировании на клетках Реншоу диссоциативные анестетики снижали ответы нейронов на ацетилхолин в значительно меньшей степени, чем на NMDA. Важно отметить, что

кетамин не усиливал процессы торможения спинальных нейронов при электрофоретическом подведении тормозных аминокислот - ГАМК и глицина. Таким образом, в указанной работе впервые были получены доказательства того, что фенциклидин и подобные ему соединения селективно блокируют постсинаптические NMDA-рецепторы.

Этот феномен был подтвержден в серии дальнейших исследований на различных моделях в опытах *in vitro*. В частности было показано, что кетамин блокировал возбуждающие постсинаптические потенциалы, вызванные NMDA в срезах гиппокампа мышей [Javitt, Zukin, 1991] и коры крыс [Harrison, Simmonds, 1985], а также снижал NMDA-стимулированное высвобождение ацетилхолина из коры мозга крыс [Lodge, Johnson, 1990]. Высокую блокирующую активность и селективность по отношению к NMDA-индуцированным ответам проявили два других вещества из этой же группы - ТСП и МК-801.

Радиолигандный анализ взаимодействия меченых антагонистов (фенциклидина, кетамина и МК-801) с рецептором показал, что они не ингибируют специфическое связывание агонистов NMDA-рецепторов, следовательно эти соединения являются неконкурентными антагонистами [Monaghan, Cotman, 1988]. Они действуют на NMDA-рецепторно-ионофорный комплекс только в присутствии агониста ("use-dependence"), откуда следует, что механизм их действия заключается в блокаде открытого ионного канала [Davies et al., 1988]. Было установлено, что глутамат усиливал связывание ^3H -МК-801 [Wong et al., 1986]. Потенцирующее действие глутамата на связывание фенциклидина и его аналогов увеличивалось и в присутствии глицина, аллостерического регулятора NMDA-рецепторов [Johnson et al., 1987].

Установить локализацию этого сайта помогли, как уже указывалось в предыдущем разделе, исследования действия ионов Mg^{2+} на блокаду канала, вызванную МК-801. Вначале был сделан вывод о том, что место связывания "фенциклидин-подобных" неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов расположено в ионном канале рядом с участком, специфически связывающим двухвалентные катионы [Huettner, Bean, 1988]; затем было показано, что эти сайты частично перекрываются [Mori et al., 1992].

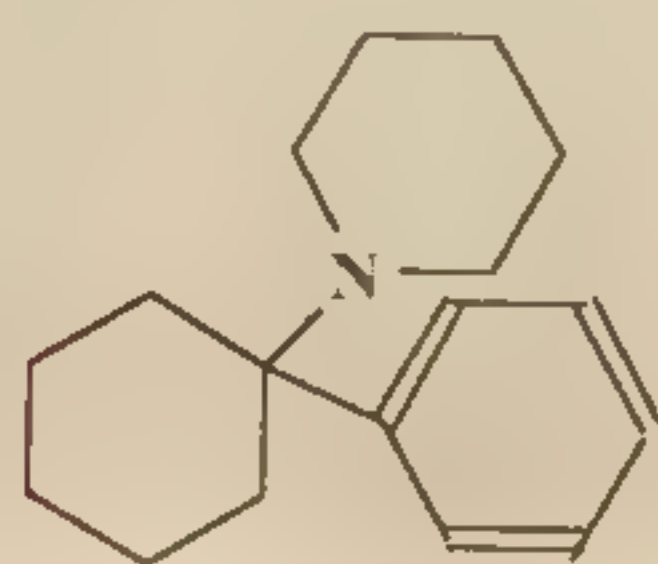
Известно, что фенциклидин и родственные ему соединения способны также взаимодействовать с σ -опиатными рецепторами [Largent et al., 1986; Zukin, Javitt, 1993]. Оказалось, однако, что собственно места специфического связывания фенциклидина в головном мозге анатомически тесно связаны с NMDA-рецепторами, что не наблюдалось для мест специфического связывания других σ -опиатных агонистов [Jarvis et al., 1990]. Такие аналоги, как ТСП и особенно МК-801, вообще не проявляли аффинности к сигма-опиатным рецепторам, а специфически связывались лишь с NMDA-рецепторным комплексом и поэтому стали широко применяться для изучения именно этих рецепторов [Wong et al., 1991]. В работе Manallac, Beart [1987] с помощью метода компьютерного молекулярного моделирования были рассчитаны модели мест связывания для фенциклидина и σ -опиатов. Оказалось, что эти модели отличаются друг от друга расположением места связывания атома азота, направлением вектора неподеленной электронной пары атома азота, а также природой и расположением других связывающих групп. Следовательно, несмотря на то, что фенциклидин и его аналоги все-таки могут связываться с σ -опиатными рецепторами, места их связывания в NMDA-рецепторно-ионофорном комплексе отличны.

Таким образом, в середине 80-х годов с помощью электрофизиологических и радиолигандных исследований был доказан факт тесной структурной и функциональной зависимости сайтов специфического связывания NMDA и

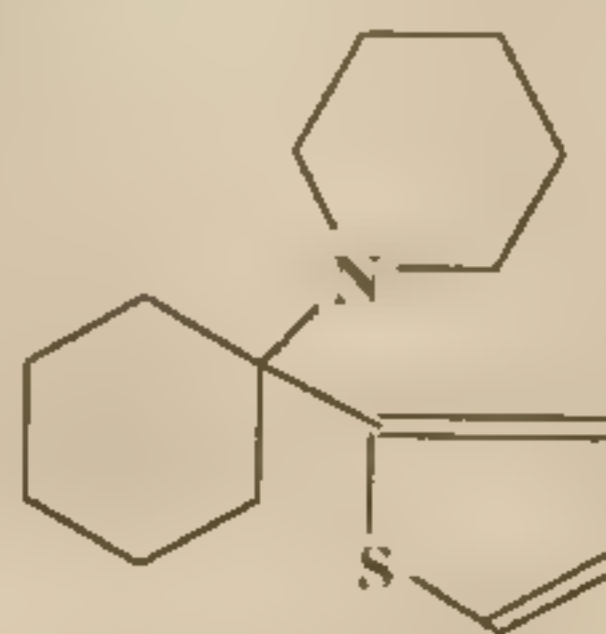
фенциклидина. Эти сведения имели огромное значение для нейробиологов и нейрофармакологов, так как положительно решали принципиальный вопрос о возможности модуляции функций NMDA-рецептора, играющих одну из ключевых ролей в осуществлении возбуждающей нейротрансмиссии в ЦНС.

На рис.2.5 приведены структуры неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов, отличающихся друг от друга по силе и селективности. Эти соединения принадлежат к классам арилциклогексиламинов и диоксала.

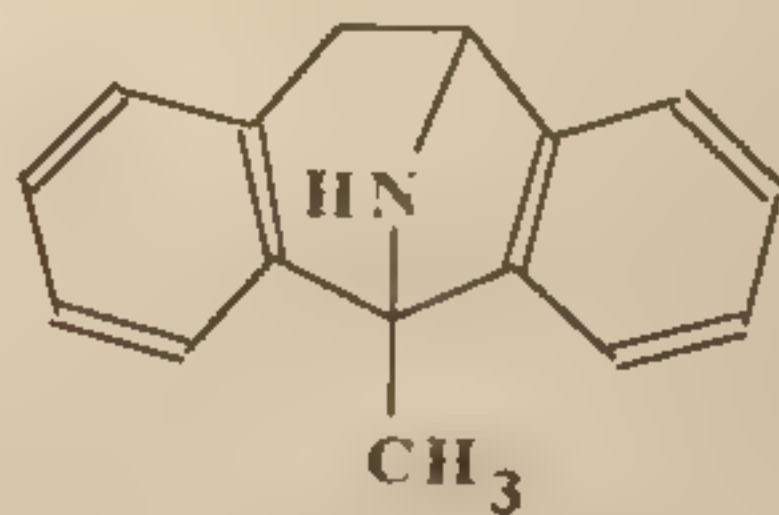
Особо следует остановиться на МК-801, на сегодняшний день наиболее изученном представителе класса неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов. МК-801 был синтезирован в начале 80-х годов сотрудниками исследовательского центра крупнейшей фармацевтической компании "Merck Sharp and Dohme" [Iversen et al., 1994]. Это вещество быстро проникало в головной мозг и оказывало выраженное противосудорожное действие, сопровождающееся анксиолитическим и центральным психотомиметическим эффектами.



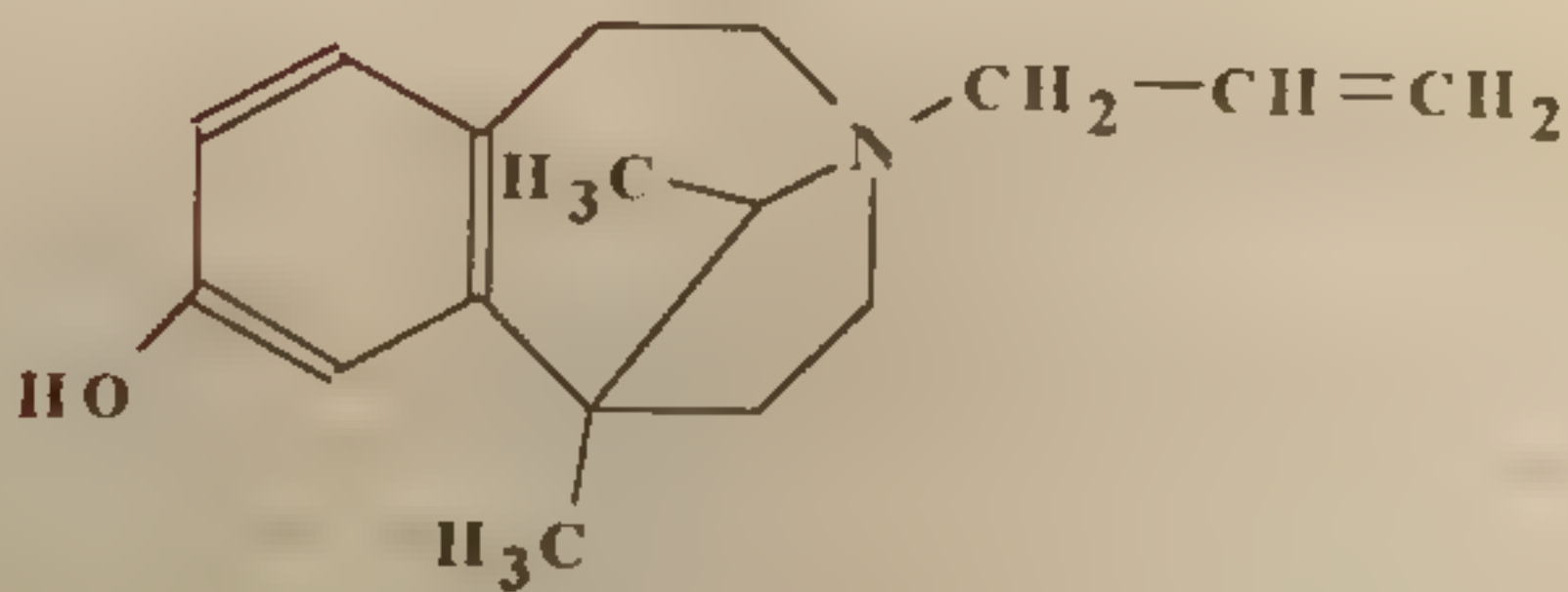
PCP



TCP



МК-801



SKF 10047

Рис. 2.5. Структуры некоторых неконкурентных антагонистов NMDA рецептора

В больших дозах это соединение, подобно диссоциативным анестетикам, вызывало выраженную анальгезию. Механизм его действия был неизвестен [Clineschmidt et al., 1982a; Clineschmidt et al., 1982b].

Молекула МК-801 хиральна, то есть существуют два ее стереоизомера. Показано, что наиболее активен (+)-изомер, известный также под названием "дизоцилпин". (-)-Изомер также проявляет свойства неконкурентного антагониста NMDA-рецепторов, но его активность в 5 раз ниже. (Связь химической структуры с биологической активностью в ряду аналогов МК-801 рассмотрена в работе [Mopp et al., 1990]).

На различных моделях *in vitro* и *in vivo* было показано, что дизоцилпин эффективно блокирует нейротоксическое действие NMDA, причем в опытах на препарате эмбриональной сетчатки цыпленка он оказался самым активным соединением [Olney et al., 1987]. Дизоцилпин предотвращал дегенерацию нейронов в мозге крыс, вызванную интрацеребральным введением самой NMDA и другими NMDA-агонистами, и при системном введении [Foster et al., 1987; Foster et al., 1988; Beal et al., 1988]. Дизоцилпин оказался также эффективен и на некоторых моделях глобальной ишемии (см., например, [McCulloch et al., 1992]). Исследование эффектов дизоцилпина, как представителя класса NMDA антагонистов, свободно проникающего в ЦНС, на различных экспериментальных моделях позволило обнаружить некоторые неожиданные его свойства. Например, он предупреждал развитие как толерантности к морфину, так и зависимости от него [Trujillo, Akil, 1991], блокировал нейротоксические эффекты, вызываемый белком GP 120 вируса иммунодефицита человека [Andersson et al., 1990]. Существует прекрасный обзор Iversen, специально посвященный МК-801 [Iversen L., 1994]. Однако клинические испытания дизоцилпина не привели, к сожалению, к положительным результатам из-за выраженности различных побочных эффектов. Поэтому велись поиски путей ослабления побочных эффектов неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов. Один из таких подходов изложен в работе [Lapin, Rogawsky, 1992], в которой показано, что блокада мускариновых рецепторов ослабляет двигательную гиперактивность, вызванную дизоцилпином.

К неконкурентным антагонистам NMDA рецепторов относятся также некоторые природные токсины пауков, по химическому строению относящиеся к полиаминам - аргиопин и аргиопинины, PhTX-433 и другие. Так как их действие исследуется в основном на насекомых, мы лишь упомянем основные работы, в которых можно найти наиболее важные результаты этих исследований [Гришин и др., 1986; Магазаник и др., 1986; Uscherwood, 1991; Antonov et al., 1987; Antonov et al., 1989; Grishin et al., 1989].

Полиаминовый сайт. В составе NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса существуют, кроме описанных выше, и другие места специфического связывания некоторых соединений. В работе Ransom, Stec [1988] был идентифицирован сайт связывания эндогенных полиаминов - спермина и спермидина [Shaw, Pateman, 1973]. Аналогично глутаминовой кислоте и глицину, эти полиамины усиливали связывание ^3H -МК-801 [Ransom, Stec, 1988; Williams et al., 1989; Reynolds I.J., 1990] и ^3H -TCP [Sacaan, Johnson, 1989a; 1989b], однако не ингибировали связывание ^3H -глицина и ^3H -CPP, что свидетельствовало о особом сайте их действия. Сдвиг кривых доза-эффект глутамата и глицина при стимуляции связывания ^3H -МК-801 спермином свидетельствует об аллостерической связи сайтов связывания полиаминов с сайтами связывания агонистов и глицина [Wong, Kemp, 1991]. Эти же полиамины потенцировали нейрональное возбуждение, вызванное сочетанным введением NMDA и глицина в опытах *in vivo* [Pullan et al., 1989]. Необходимым условием для такого действия полиаминов является именно стимуляция NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса одновременно агонистами самого рецептора и глицинового сайта. Конкурентные агонисты и антагонисты глицинового сайта по

отдельности не устраняют эффект полиаминов. Полиамины при взаимодействии с полиаминовым сайтом положительно модулируют связывание глицина. Этот сайт находится в пределах NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса и не чувствителен ни к конкурентным антагонистам типа CPP, ни к антагонистам глицинового сайта типа 7-хлоркинуреновой кислоты.

Высказывается предположение, что полиамины вызывают такие изменения в NMDA-рецепторно-ионофорном комплексе, которые способствуют повышению аффинности мест связывания неконкурентных антагонистов в ионном канале [Enomoto et al., 1993].

Было обнаружено, что α -дифторметилорнитин обладает защитным действием против NMDA-индуцированной нейротоксичности [Paschen et al., 1988; Markwell et al., 1990]. Известно, что это соединение является ингибитором фермента орнитиндекарбоксилазы, скорость-лимитирующего фермента синтеза полиаминов. Поэтому возникло предположение, что NMDA-индуцированная нейротоксичность связана с активацией орнитиндекарбоксилазы, и поэтому ингибиторы этого фермента, способные проникать в мозг, могут обладать нейропротективным действием. Однако концентрация α -дифторметилорнитина, в которой он способен проявлять этот эффект (5 мМ) очень высока. Поэтому механизм его защитного действия остается неясным.

Для полиаминового сайта в настоящее время обнаружены собственные антагонисты - это производные дифенилпиперидиноэтанола ифенпродил {4-бензил-1-[(3-гидрокси-3-(4-гидроксифенил)проп-2-ил)пиперидин]} и его аналог элипродил {(4-хлорфенил)-[(4-фторфенил)метил]-1-пиперидиноэтанол}, обладающие антиишемическим действием [Gotti et al., 1988]. Было показано, что эти соединения неконкурентно подавляют NMDA-индуцированное повышение уровня цГМФ в срезах мозга и также неконкурентно ингибируют связывание ^3H -CPP и ^3H -TCR [Carter et al., 1988]. Неспособность глицина изменять активность ифенпродила при ингибировании связывания ^3H -МК-801 указывает на то, что места их действия различны. Ифенпродил и элипродил дозозависимо, но не полностью, ингибируют NMDA-индуцированную деполяризацию нейронов [Carter et al., 1988]. Исследования с меченым ^3H -ифенпродилом указывают, что высокоаффинные места его связывания могут входить в NMDA-рецепторно-ионофорный комплекс [Shoemaker et al., 1985]. Это связывание частично ингибируется конкурентными NMDA антагонистами и полностью спермином и спермидином, поэтому было высказано предположение, что ифенпродил и элипродил действуют на полиаминовый сайт NMDA-рецепторно-ионофорного комплекса [Carter et al., 1989].

Описано также обратимое, неконкурентное и потенциал-зависимое ингибирование NMDA-индуцированных ответов в опытах на ооцитах *Xenopus*, инъецированных РНК мозга крысы, такими полиаминсодержащими токсинами, как филантотоксин и аргиотоксин [Brackley et al., 1993].

Таким образом, эндогенные полиамины в физиологических концентрациях [Shaw, Pateman, 1973] модулируют функции NMDA рецептора, причем сайт их связывания входит в состав всего комплекса и расположен на внутренней стороне постсинаптической мембраны нейрона [Wong, Kemp, 1991].

2.3. AMPA рецептор

Как уже указывалось выше, ионотропные рецепторы ВАР иногда разделяют на NMDA- и неNMDA подтипы. В последнем случае из этого подтипа выделяют еще два - AMPA и каинатный типы.

Установлено, что активация AMPA рецепторов в мозге приводит к изменению проницаемости постсинаптической мембраны для одновалентных катионов - калия и натрия. При этом между процессами изменения ионной проницаемости мембраны, сопровождающими стимуляцию NMDA и AMPA рецепторов, имеется ряд существенных различий. В частности, квисквалат-индуцированные ионные токи могут возникать при низких значениях проводимости постсинаптической мембраны, в то время как для появления NMDA-индуцированных токов необходимо повышение проводимости мембраны в 5-10 раз [Ascher, Nowak, 1988]. Открывание ионных каналов, сопряженных с AMPA рецепторами, не зависит от величины потенциала мембраны, такие каналы относятся к потенциал-независимому типу и опосредуют потенциал-независимое возбуждение в нейрональных синапсах, тогда как ионные каналы, сопряженные с NMDA рецепторами, являются потенциал-зависимыми. Стимуляция AMPA рецепторов, в отличие от NMDA рецепторов, не сопровождается входом ионов Ca^{2+} во внутриклеточное пространство, что, в частности, доказано при изучении переноса радиоактивного Ca^{2+} в гранулярные клетки мозжечка при возбуждении агонистами рецепторов ВАР неNMDA типа, связана не с натриевым током, а с прямым проникновением в клетку ионов кальция и активацией кальций-зависимых ферментативных процессов [Brorson et al., 1994].

AMPA-рецепторный ионный канал может быть реконструирован *in vitro* из белков, полученных экспрессией одной, или коэкспрессией любых двух из четырех субъединиц, называемых GluR1-GluR4 (или GluRA-GluRD), каждая из которых состоит примерно из 900 аминокислотных остатков [Seeburg, 1993].

Как и для NMDA рецепторов, показана гетерогенность популяции AMPA рецепторов в ЦНС млекопитающих [Wilsch et al., 1995].

Агонисты AMPA рецепторов. Работ по исследованию связи химической структуры с биологической активностью среди агонистов и антагонистов AMPA рецепторов, по сравнению с аналогичными работами по лигандам NMDA рецепторов, значительно меньше. Наибольший вклад в поиск лигандов рецепторов ВАР, особенно агонистов AMPA (квисквалатных) рецепторов, в изучение связи химической структурой с биологической активностью внесли сотрудники датской школы, возглавляемой P.Krogsgaard-Larsen. Ими, в частности, был выполнен цикл работ по синтезу аналогов природной иботеновой кислоты, агониста NMDA рецепторов, содержащейся в *Amanita muscaria*.

Это привело к открытию таких агонистов, как сама AMPA [(RS)-2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота], (RS)-2-амино-3-(3-гидрокси-5-третбутилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота (ATPA), (RS)-2-амино-3-(3-гидрокси-5-бромметилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота (ABPA), 3-гидрокси-4,5,6,7-тетрагидроизоксазоло[4,5-с]пиридин-5- и -7-карбоновые кислоты (5-НРСА и 7-НРСА, соответственно) [Brehm et al., 1988; Krogsgaard-Larsen et al., 1986]. Как уже указывалось выше, AMPA оказалась наиболее активным агонистом и дала название этому классу рецепторов. Из-за высокой селективности взаимодействия только с одним типом рецепторов ВАР ^3H -AMPA стала широко применяться в радиолигандных исследованиях. Из энантиомеров AMPA наибольшей активностью обладает L-изомер.

Рентгеноструктурный анализ двух жестких аналогов AMPA (5-НРСА и 7-НРСА) показал, что изоксазольный цикл этих молекул планарен, а шестичленное кольцо находится в конформации "полукресла" с карбоксильной группой в экваториальном положении [Krogsgaard-Larsen et al., 1986]. По мнению авторов

этих работ, конформация "полукресла" с экваториальным и (или) аксиальным расположением карбоксильной группы и является биологически активной.

Недавно был найден новый высокоактивный агонист AMPA рецепторов - (RS)-2-амино-(3-карбокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота (АСРА) [Madsen, Wong, 1992]. По своей структуре это соединение отличается от AMPA лишь тем, что оксо-группа в положении 3 изоксазольного цикла заменена на карбоксильную. АСРА в четыре раза активнее самой AMPA ингибировала связывание ^3H -AMPA, слабо влияла на связывание ^3H -каиновой кислоты и не влияла на NMDA-зависимое связывание ^3H -глутаминовой кислоты. В некоторых структурах коры АСРА была в четыре раза сильнее AMPA по возбуждающему эффекту, причем ее деполяризующее действие блокировалось избирательным агонистом AMPA рецепторов (CNQX), не блокировалось антагонистами NMDA рецепторов (AP5) [Madsen, Wong, 1992].

К агонистам AMPA рецепторов относится и природная 3N-оксалил-L-2,3-диаминопропионовая кислота (ODAP), представляющую собой структурный аналог дикарбоновых аминокислот, в котором две метиленовые группы заменены амидной [Bridges et al., 1989; Ross et al., 1989]. Интересным и специфическим примером

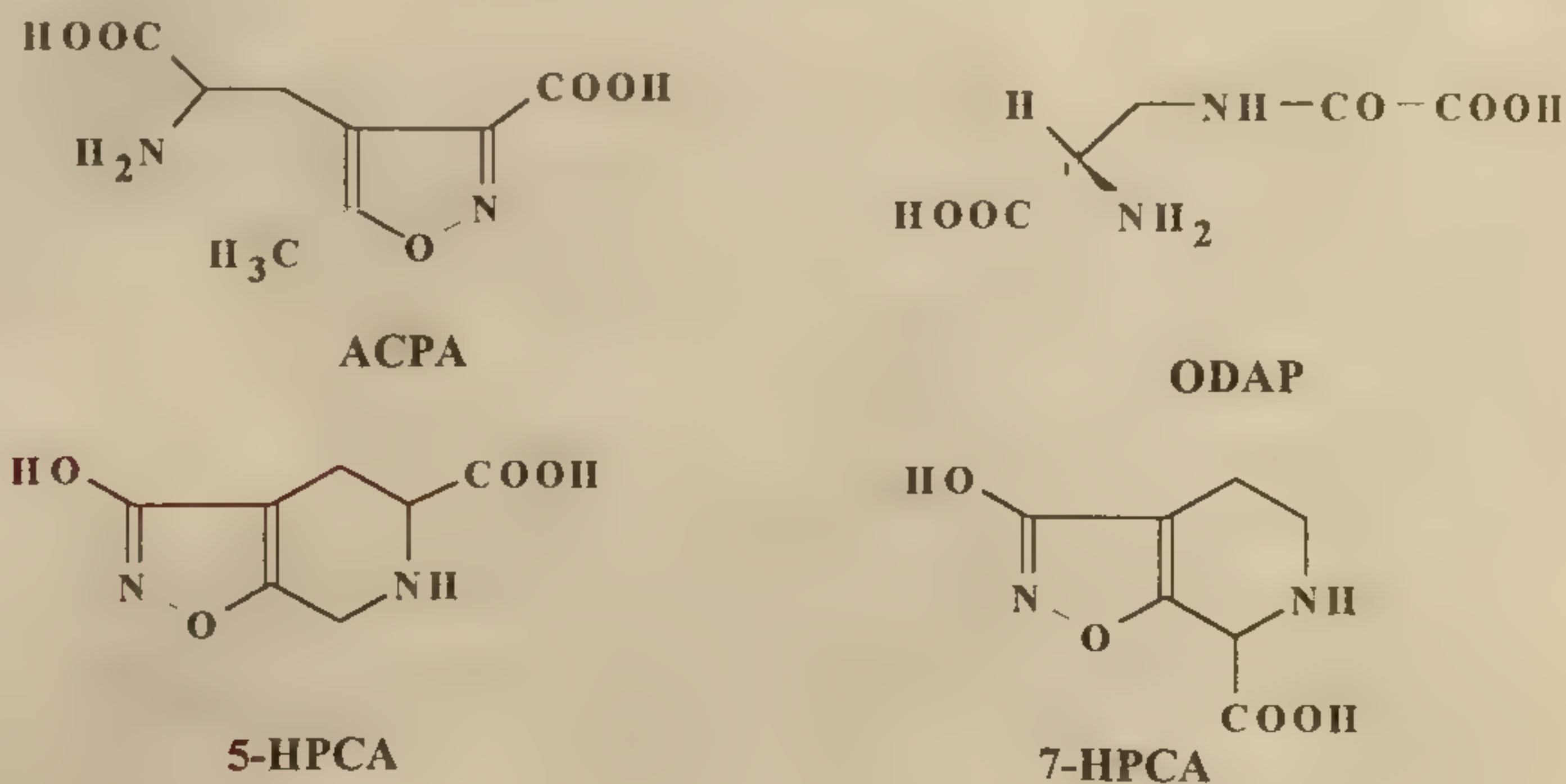


Рис.2.6 Агонисты AMPA рецепторов

агонистов AMPA рецепторов является и одно из родственных ODAP соединений, а именно бета-N-метиламиноаланин (3N-метил-L-2,3-диаминопропионовая кислота, ВМАА). Это соединение не содержит, в отличие от ODAP, второй кислотной группы и поэтому, казалось бы, не может проявлять свойства лигандов рецепторов ВАК. Однако оказалось, что она способна взаимодействовать с AMPA рецепторами в присутствии бикарбонат-иона [Corani et al., 1991; Allen et al., 1993; Matsuoka et al., 1993]. Двухзаряженный бикарбонат-ион связывается с высокоосновной метиламиногруппой ВМАА, образуя при этом карбамат, обладающий двумя отрицательными и одним положительным зарядами, то есть этот комплекс обладает ВАКергическим фармакофором и проявляет свойства лиганда рецепторов AMPA типа [Nunn et al., 1991].

Кроме указанных производных 3-гидроксиизоксазола, способностью взаимодействовать с AMPA рецепторами обладают такие соединения, как 2-(2-оксо-1Н-пирид-6-ил)аланин, виллардин и бромвиллардин, гомоиботеновая кислота и некоторые ее аналоги, а также некоторые карбоциклические дикарбоновые аминокислоты [Christensen et al., 1992; Пиотровский, Думпис, 1989].

Антагонисты AMPA рецепторов. Одним из существенных препятствий на пути изучения физиологической роли AMPA рецепторов является отсутствие сильных и селективных антагонистов. Углубленное изучение действия диэтилового эфира L-глутаминовой кислоты (ДЭЭГ), у которого еще в начале 70-х годов была обнаружена способность блокировать глутамат-индуцированное возбуждение нейронов, показало, что он является довольно слабым и относительно селективным антагонистом AMPA рецепторов, не действуя на NMDA- и каинат-индуцированные ответы. Имеются, однако, данные, что ДЭЭГ блокирует возбуждающее действие ацетилхолина [Davies, Watkins, 1979; Hicks et al., 1978; McLennan, Lodge, 1979]. Блокирующее действие ДЭЭГ проявлялось в миллимолярных концентрациях, к тому же показано, что в концентрации 10 мМ он подавлял и электрическую активность пресинаптических волокон [Wigstrom et al., 1985]. В некоторых исследованиях вообще не было зарегистрировано блокирования ответов, вызванных аппликацией ВАК, с помощью ДЭЭГ [Collingridge et al., 1983; King et al., 1985; MacDonald et al., 1977]. К тому же его применение ограничено невысокой гидролитической стабильностью в организме [Мишин и др., 1991].

Нейрональные ответы, индуцированные квисквалатом, снижали также кинуреновая кислота [Ferkany, 1986], пиперазин-2,3-дикарбоновые кислоты [Ganong et al., 1986] и γ -D-глутамиламинометансульфоновая кислота (GAMS) [Jones et al., 1990], однако эти соединения тормозили одновременно и синаптическое возбуждение, вызываемое агонистами NMDA типа, и лишь GAMS проявил приемлемую степень избирательности по отношению к AMPA рецепторам [Watkins et al., 1991].

Определенные надежды исследователей были связаны с появившимися относительно недавно сведениями о том, что некоторые производные хиноксалин-2,3-диона проявляют селективную антагонистическую активность по отношению к AMPA рецепторам. Например, 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дион (CNQX) и 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион (DNQX) взаимодействовали с местами специфического связывания каината, квисквалата и AMPA, но не с местами связывания агонистов NMDA типа [Hoppe et al., 1988], и избирательно подавляли синаптическое возбуждение, индуцированное неNMDA агонистами в препаратах неокортекса крыс и спинного мозга лягушек в опытах *in vitro* [Fletcher et al., 1988].

Однако вскоре выяснилось, что CNQX и DNQX селективно блокируют неNMDA рецепторы только в случае высокой концентрации в среде глицина. В дальнейшем этот неожиданный и интересный факт получил свое объяснение: хиноксалин-2,3-дионы конкурентно блокируют глициновый связывающий сайт в NMDA-рецепторно-ионофорном комплексе [Kessler et al., 1989]. При отсутствии глицина в среде CNQX селективно блокирует глициновый рецептор, а при повышении содержания глицина происходит конкурентное вытеснение CNQX этой аминокислотой с глицин-связывающего сайта, и после этого уже CNQX проявляет антагонизм к AMPA и каинатным рецепторам. Поэтому в опытах *in vivo*, когда невозможно контролировать содержание глицина в среде, пока и невозможно дать точный ответ, в какой степени указанные производные хиноксалиндиона (к которым можно добавить 6-хлор- и 6,7-дихлорпроизводные) блокируют неNMDA рецепторы и глициновый сайт NMDA рецептора. Среди других производных

хиноксалин-2,3-диона следует отметить трициклическое производное NBQX, сильный ингибитор связывания ^3H -AMPA [Watkins et al., 1991]. Поиск новых неNMDA антагонистов в ряду производных хиноксалин-2,3-диона продолжается. Недавно появилась работа [Ohmori et al., 1994], посвященная синтезу и исследованию зависимости ВАРгической антагонистической активности от химической структуры в ряду таких соединений. При этом авторами было показано, что 1Н-имидазол-1-ильный остаток является биоизостером циано- и нитрогрупп. Наиболее активным антагонистом в серии, синтезированной авторами, оказался 6-(1Н-имидазол-1-ил)-7-нитрохиноксалин-2,3-дион.

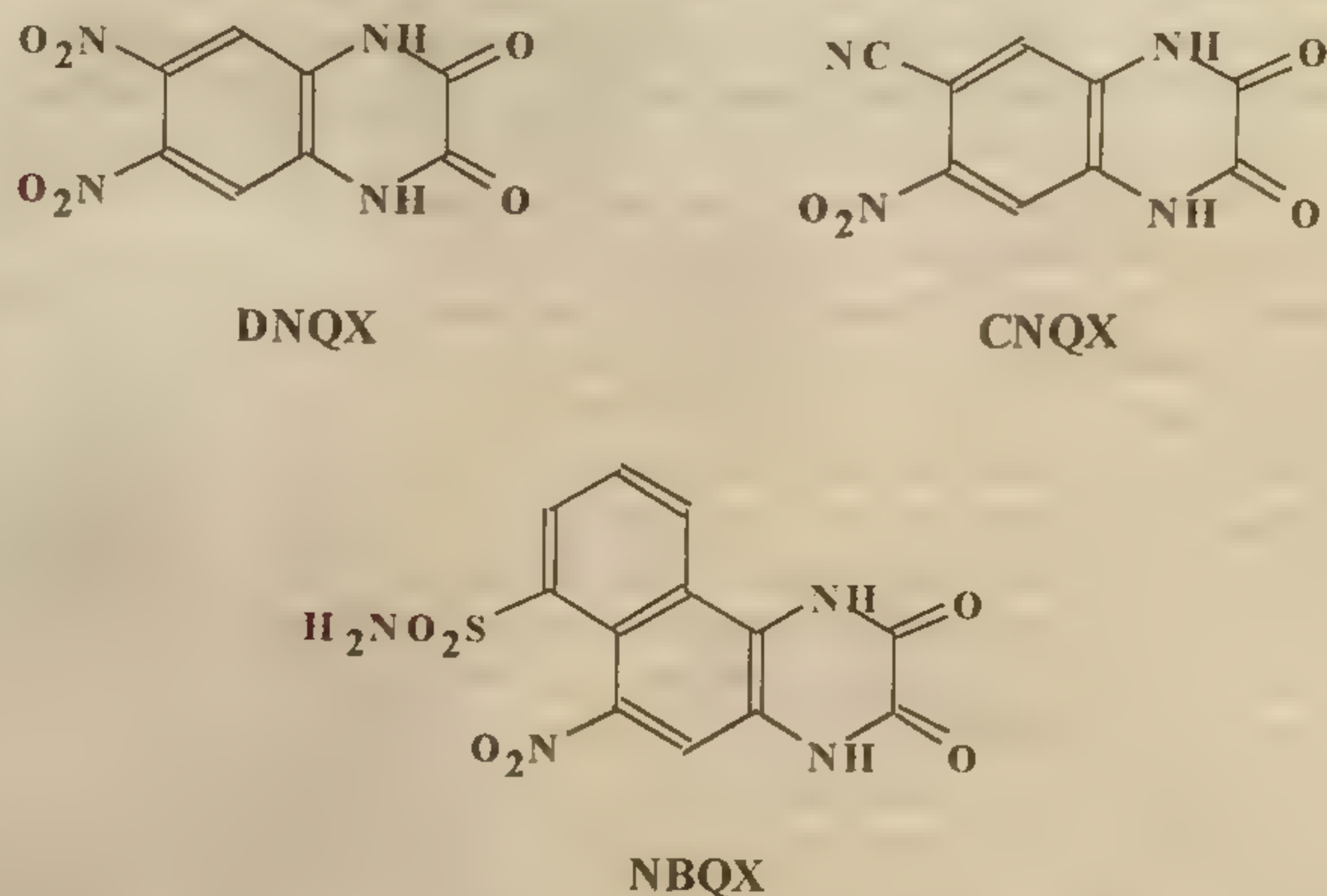


Рис.2.7. AMPA антагонисты

Свойства избирательного и селективного антагониста AMPA рецепторов в опытах *in vitro* и *in vivo* проявляет недавно синтезированная 2-амино-3-[3-(карбометокси)-5-метилизоксазол-4-ил]пропионовая кислота (АМОА) [Krogsgaard-Larsen et al., 1991]. По химической структуре это соединение представляет собой молекулу AMPA с одной блокированной кислотной функцией. Вспомнив о том, что блокирование кислотных функций у самой L-глутаминовой кислоты, превращение ее в ДЭЭГ, тоже приводит к соединению, проявляющему антагонистические свойства, можно высказать предположение, что такая химическая модификация молекул агонистов AMPA рецепторов может явиться одним из направлений синтеза AMPA антагонистов.

Таким образом, ситуация с избирательными конкурентными антагонистами AMPA рецепторов резко отличается от таковой в случае NMDA рецепторов, для которых изучается уже третье поколение конкурентных антагонистов. Поэтому в настоящее время поиск высокоселективных антагонистов AMPA рецепторов продолжается, тем более, что применение подобных соединений в качестве церебропротективных средств при ишемии головного мозга имеет определенные перспективы.

Блокаторы ионного канала. Как уже обсуждалось в предыдущей главе, в NMDA-рецепторно-ионофорном комплексе существуют места связывания конкурентных и неконкурентных антагонистов, а так же и другие сайты, связывание с которыми

различных лигандов модулирует функции всего комплекса. Однако и в AMPA-рецепторно-ионофорном комплексе существуют сайты связывания не только для агонистов и конкурентных антагонистов [Lodge et al., 1991; Jones et al., 1990]. Одно из таких соединений - филантотоксин, "use-dependent" антагонист AMPA-рецепторов, блокирующий ионный канал [Jones et al., 1990]. Известны и некоторые другие соединения, антагонистическое действие которых на AMPA рецепторы связано с блокадой ионного канала: пентобарбитал [Miljkovic, MacDonald, 1986] и токсины пауков [Akaike et al., 1988].

Но этим сходство в возможностях регуляции функций AMPA и NMDA рецепторов не ограничивается. В работе Donevan и Rogawski [1993] показано, что соединение GYKI 52466 [1-(4-аминофенил)-4-метил-7,8-метилендиокси-5H-2,3-бензодиазепин] является высокоизбирательным неконкурентным антагонистом неNMDA рецепторов, причем механизм его действия отличается от других неконкурентных антагонистов этих типов рецепторов и является аллостерическим, а не каналоблокирующим.

GYKI 52466 по химической структуре отличается от классических бензодиазепинов-анксиолитиков в первую очередь тем, что он является производным 2,3-, а не 2,4-бензодиазепа. Сродство GYKI 52466 к классическому бензодиазепин-связывающему сайту на несколько порядков ниже, чем у диазепама [Tarnava et al., 1989, 1990]. У этого соединения сначала были найдены миорелаксирующие свойства [Tarnava et al., 1989]. Затем был показан его антагонизм к ответам, вызываемым неNMDA агонистами [Tarnava et al., 1990; Quardo, Durand, 1991]. GYKI 52466 - первый неконкурентный неNMDA антагонист, совершенно не действующий на NMDA-индуцированные ответы [Donevan, Rogawski, 1993]. Он блокирует ионные токи, вызываемые неNMDA агонистами, и их нейротоксическое действие, включая ишемическую дегенерацию нейронов [Zorumski et al., 1993]. Неконкурентный механизм его действия подтвержден данными электрофизиологических и нейротоксикологических экспериментов. В качестве возможного объяснения этих свойств GYKI 52466 авторы выдвигают гипотезу о существовании в неNMDA-рецепторно-ионофорном комплексе неизвестного ранее сайта связывания бензодиазепинов. Отсутствие подобного сайта в NMDA-комплексе обуславливает избирательность действия GYKI 52466 на неNMDA рецепторы. Известно, что циклотиазид способен подавлять быструю десенситизацию AMPA рецепторов [Yamada, Rothman, 1992]. В то же время он может блокировать и действие GYKI 52466 на каинат- и AMPA-индуцированные токи, поэтому бензодиазепин-связывающий сайт неNMDA рецепторов управляет, вероятно, десенситизацией этих рецепторов [Zorumski et al., 1993].

Тот факт, что GYKI 52466 неконкурентно блокирует ответы как на квисквалат, так и каинат, интересен в связи с вопросом о том, действуют эти ВАР на один и тот же или разные рецепторы. Если рецепторы для квисквалата и каината различны, то оба этих рецепторных комплекса должны иметь похожие бензодиазепин-связывающие сайты, так как GYKI 52466 блокирует действие как одной, так и другой аминокислоты, и в обоих случаях эти эффекты чувствительны к действию циклотиазида. Авторы работы [Zorumski et al., 1993] считают, что более приемлемым является предположение о наличии одного неNMDA рецепторно-канального комплекса, отвечающего как на действие квисквалата, так и каината, в состав которого и входит бензодиазепин-связывающий сайт. Тем более, что это согласуется с известными данными о фармакологическом взаимодействии квисквалата и каината в культуре нейронов гиппокампа [Patneau, Mayer, 1991, Thio et al., 1991].

Однако окончательные доказательства гипотезы о существовании в AMPA-рецепторно-ионофорном комплексе бензодиазепин-связывающего места и установление его роли могут быть получены только после синтеза большого ряда аналогов GYKI 52466 и циклотиазида. (О бензодиазепин-связывающем сайте AMPA рецептора см. также обзор Rogawski [1993]).

Заключая этот раздел, посвященный рецепторам ВАР AMPA типа, необходимо заметить, что в настоящее время сведений о молекулярных механизмах их функционирования очень мало, можно даже сказать, что крайне мало по сравнению с их физиологической значимостью для реализации функций мозга. Этот недостаток наших знаний об AMPA рецепторах мозга в настоящий момент объясняется отсутствием широкого набора специфических агонистов и, что более важно, антагонистов этого типа рецепторов ВАР, которые могли бы с успехом использоваться в различных экспериментальных моделях. Поэтому поиск веществ, селективно взаимодействующих с AMPA рецепторами, является необходимым условием дальнейшего прогресса исследований функций и физиологической роли этих рецепторов.

Физиологическая роль AMPA рецепторов изучена не так хорошо, как в случае NMDA рецепторов. Однако известно, что эти рецепторы также участвуют в развитии судорожных состояний.

2.4. Каинатные рецепторы

Каиновая кислота, природная аминокислота, выделенная из морских водорослей *Digenia simplex*, дала название третьему типу ионотропных рецепторов ВАР. О каинатных рецепторах известно довольно мало. В первую очередь это связано с тем, что до сих пор не обнаружены селективные антагонисты этого типа рецепторов ВАР. Вещества, способные блокировать каинат-индуцированное возбуждение в синапсах, блокируют и ответы нейронов на аппликацию AMPA агонистов. Естественно, в методическом аспекте это значительно затрудняет исследования особенностей каинатных рецепторов. Хотя участие каинатных рецепторов в нейродеструктивных процессах в ЦНС установлено давно, сведения о физиологической роли этого типа рецепторов ВАР как в функционировании синапсов и нейронов, так и на системном уровне мозговой деятельности крайне скудны. Поэтому интерес к каинатным рецепторам, в стратегическом направлении прежде всего предполагающий, в той или иной степени, создание новых нейротропных препаратов, у большинства исследователей невысок.

При стимуляции специфических постсинаптических рецепторов происходит открывание потенциал-независимых каналов для ионов K^+ и Na^+ [Mayer, Westbrook, 1987]. То же самое происходит и при действии агонистов AMPA типа, однако каиновая кислота способна также стимулировать вход ионов Ca^{2+} внутрь нейронов за счет активации пресинаптических рецепторов [Ferkany et al., 1989]. В частности, для гранулярных клеток мозжечка в культуре установлено, что повышение пререноса $^{45}Ca^{2+}$ в клетке происходит при добавлении NMDA или каината, но не квисквалата [Wroblewska et al., 1993]. В области СА3 гиппокампа обнаружены пресинаптические каинатные рецепторы, модулирующие концентрацию внутриклеточного свободного кальция в нервных окончаниях [Malva et al., 1995].

Высокоаффинный каинатный рецептор *in vitro* может быть реконструирован из субъединиц GluR5, GluR6 и GluR7, а также субъединиц KA1 и KA2 [Seeburg, 1993]. Гибридизационный анализ *in situ* показывает, что эти пять субъединиц экспрессируются в разных структурах мозга, что свидетельствует о том, что каинатный рецептор включается во многие нейрональные цепи в мозге. Важно и то,

что места экспрессии этих субъединиц в мозге примерно совпадают с места высокоаффинного связывания ^3H -каината [Seeburg, 1993].

Структуры известных в настоящее время агонистов каинатных рецепторов в той или иной степени близки самой каиновой кислоте (известной также под названием α -каиновой) (см. рис.2.8). Большой интерес представляет домоевая кислота, выделенная из морских водорослей *Chondria armata*. По агонистической активности она превосходит каиновую кислоту, что, очевидно, связано с наличием большого непредельного заместителя в положении 4 пирролидинового цикла. Недавно из плодов *Clitocybe acromelalga* были выделены два соединения, структурно схожие с каиновой и домоевой кислотами - акромеловые кислоты А и В, которые оказывали в 100 раз более выраженный деполяризующий эффект в нервно-мышечных соединениях рака, нежели каиновая кислота [Shanozaki, 1988].

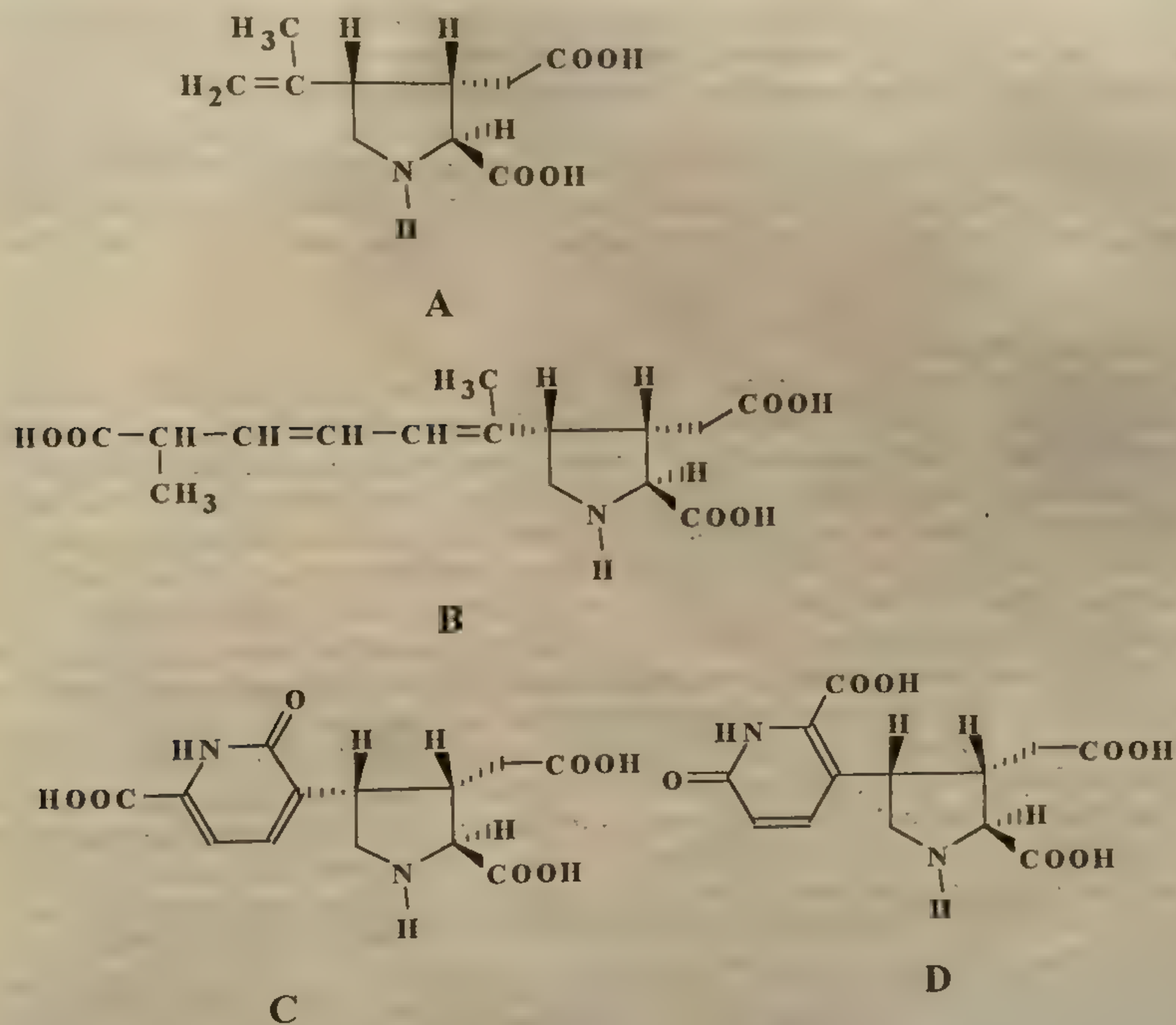


Рис.2.8. Агонисты каинатных рецепторов: А - каиновая кислота, В - домоевая кислота, С - акромеловая кислота А, D - акромеловая кислота В.

Как уже подчеркивалось, на сегодняшний день неизвестны специфические антагонисты каинатных рецепторов, хотя возбуждение нейронов, вызываемое каиновой кислотой, может устраняться целым рядом соединений, блокирующих и другие типы рецепторов ВАК. Это относится, в частности, к γ -D-глутамилметан-

сульфоновой кислоте, производным пиперазин-2,3-дикарбоновой и самой каиновой кислот, которые в различной степени способны подавлять также NMDA- и квисквалат-индуцированное возбуждение [Johnson, Koerner, 1988]. Из ныне известных антагонистов наиболее выраженной способностью блокировать каинатные и AMPA рецепторы обладают DNQX и CNQX, проявляющие антагонистическую активность в низких, микромолярных концентрациях [Hoppe et al., 1988]. Проведенный анализ по Шилду показал, что антагонизм этих соединений по отношению к квисквалату и каинату носит конкурентный характер [Birch et al., 1988]. В высоких дозах DNQX неконкурентно блокирует и NMDA-индуцированное возбуждение. Другое производное хиноксалина - 6,7-дихлор-3-гидроксихиноксалин-2-карбоновая кислота, относительно селективно, по сравнению с AMPA рецепторами, может блокировать каинатные рецепторы [Frey et al., 1988].

Избирательным и конкурентным антагонистом каинатных рецепторов является также 2-амино-3-[2-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)метил]-5-метил-3-оксо-изоксазолин-4-ил]пропионовая кислота (AMNH) [Krogsgaard-Larsen et al., 1991].

Полиаминсодержащие соединения, филантотоксин и его синтетические аналоги, способны ингибировать эффекты каината, при этом действие этих соединений неспецифично, так как ими же блокируются и NMDA-индуцированные ответы [Blackley et al., 1993].

2.5. L-AP4 рецепторы

Идентификация трех основных типов рецепторов ВАР (NMDA, AMPA и каинатного) так или иначе связана с их селективными агонистами, оказывающими выраженное деполяризующее действие на различные нейроны мозга. В отличие от них, выделение четвертого типа ионотропных рецепторов ВАР, так называемых L-AP4-чувствительных рецепторов (L-AP4), основано исключительно на опытах со специфическим антагонистом. Сама L-AP4 была синтезирована и изучена в рамках поиска антагонистов рецепторов ВАР в ряду производных кислых аминокислот, содержащих в качестве ω -кислотной группы фосфонатный остаток [McLennan, 1979]. Уже в самом начале исследований способность L-AP4 устранять синаптическое возбуждение в различных популяциях нейронов вызвала особый интерес, так как этот феномен наблюдался только в строго определенных отделах мозга. В частности, L-AP4 при перфузии гиппокампальных срезов выражено угнетала возбуждение гранулярных клеток зубчатой извилины при стимуляции латерального перфорантного пути [Koerner, Cotman, 1981]. Подобным же образом L-AP4 блокировала моносинаптические ВПСР вентральных корешков спинного мозга, регистрируемые при раздражении дорзальных корешков [Davies, Watkins, 1982], нейрональные ответы в обонятельной коре, вызванные электрораздражением латерального обонятельного тракта [Collins, 1982] и, наконец, синаптическое возбуждение в системе мшистых волокон СА3 зоны гиппокампа [Lanthorn et al., 1994]. Еще большее значение имело отсутствие у L-AP4 способности блокировать синаптическое возбуждение при аппликации агонистов известных типов рецепторов ВАР в указанные выше структуры мозга. На основании этого и было высказано предположение о существовании четвертого типа рецепторов ВАР, специфическим антагонистом которых является L-AP4 (D-изомер не отличается подобной селективностью и блокирует NMDA-, каината и квисквалат-вызванную деполяризацию). В ряде работ показано, что L-AP4-чувствительные рецепторы могут иметь не только постсинаптическую, но и пресинаптическую локализацию [Cotman et al., 1986], что необходимо учитывать при объяснении некоторых

эффектов антагониста. Например, в культуре гиппокампальных нейронов было продемонстрировано, что L-AP4 угнетает синаптические ответы, действуя пресинаптически [Smart, 1989].

В поиске других антагонистов типа L-AP4 были синтезированы его циклопентильные и циклогексильные аналоги, некоторые из которых проявили высокую активность [Crooks et al., 1988]. Ситуация с агонистами этого типа рецепторов ВАР остается неопределенной. По существу, сейчас только одно соединение может претендовать на роль агониста и, возможно, эндогенного лиганда этих рецепторов. Речь идет о мозгоспецифическом дипептиде N-ацетил-L-аспартил-L-глутаминовой кислоте (NAAG), которому был посвящен ряд интересных исследований. В продолговатом мозге, он присутствует в достаточно заметной концентрации в структурах переднего мозга, содержащих L-AP4 рецепторы: зрительный бугор, латеральное коленчатое ядро, верхнее ядро четверохолмия, энторинальная кора и гиппокампальная формация [Anderson et al., 1987]. При повреждении конкренных NAAG была впервые обнаружена в головном мозге кролика, а впоследствии и в мозговой ткани млекопитающих и человека [Curatolo et al., 1967].

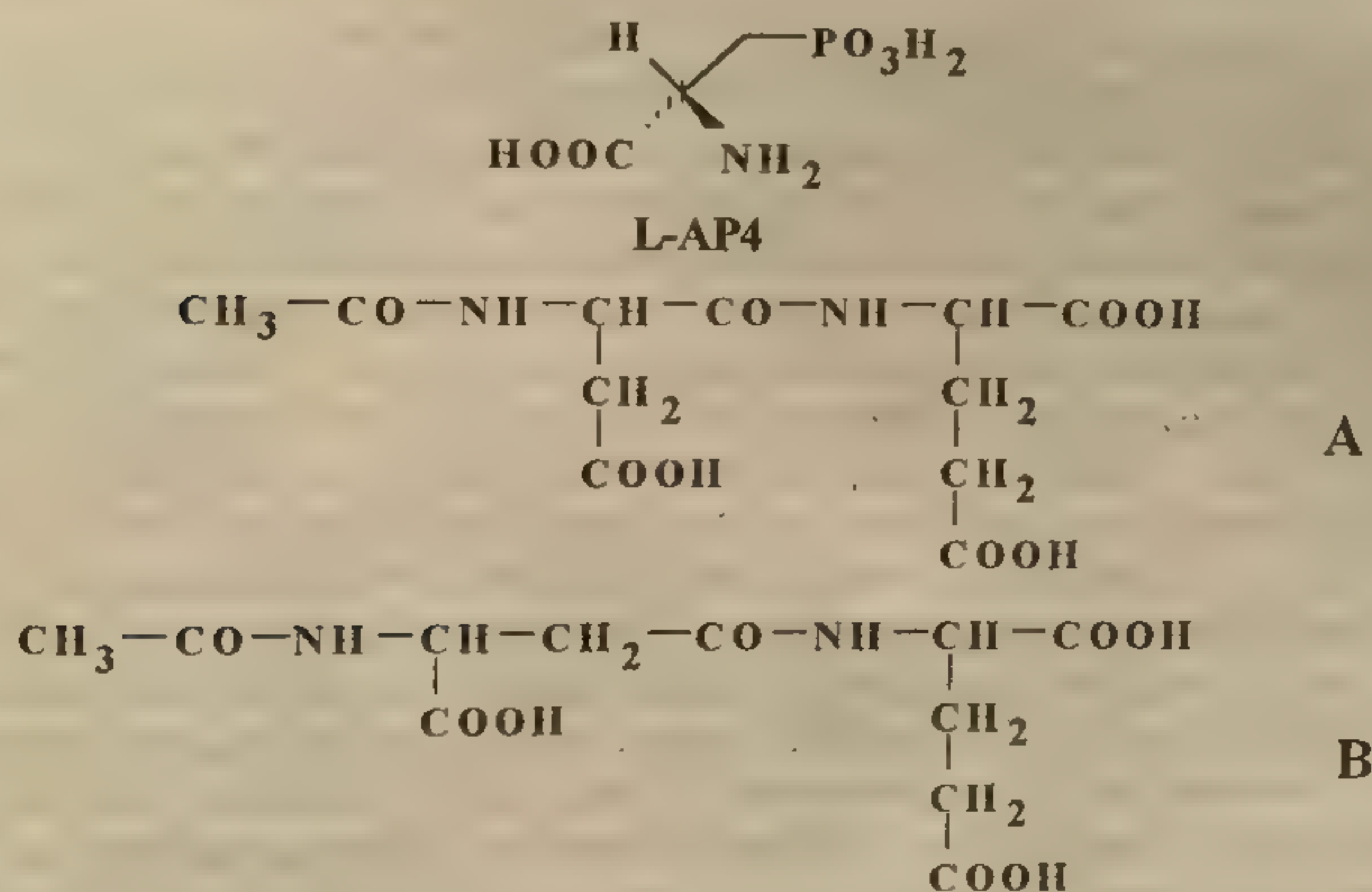


Рис.2.9. Лиганды L-AP4 рецепторов (А - NAAG, В - β-изомер)

В нейрофизиологических опытах было установлено, что NAAG вызывает возбуждение нейронов при его ионтофоретическом подведении к гиппокампальным пирамидальным клеткам СА1 зоны и пириформной коры у крыс [French-Mullen et al., 1985]. NAAG-индуцированная стимуляция пирамидаьных клеток селективно блокируется L-AP4, но не AP5, антагонистом NMDA рецепторов, что позволило высказать предположение о его взаимодействии с рецепторами L-AP4 типа. Однако при интрацеребровентрикулярном введении мышам сама NAAG не проявила возбуждающего действия, а неожиданно сильное судорожное действие было обнаружено у изомерного соединения - N-ацетил-β-L-аспартил-L-глутаминовой кислоты [Piotrovsky et al., 1991].

В пользу предположения о том, что NAAG может являться эндогенным лигандом рецепторов ВАК свидетельствует также наличие специфических систем его захвата и утилизации. NAAG проявляет высокое сродство и специфичность к хлор-зависимым участкам связывания ^3H -глутамата, которые относятся к системе транспорта медиатора из синаптической щели в пресинаптическую терминаль [Koller, Coyle, 1985]. Параллельный сдвиг кривой связывания ^3H -глутамата наблюдался при добавлении в инкубационную среду глутаминовой кислоты, L-AP4 и NAAG, но не NMDA и каиновой кислоты. Процесс деградации дипептида проходит под действием специфической пептидазы мозга, которая расщепляет его на N-ацетиласпартат и глутаминовую кислоту [Ferkany, 1986]. До сих пор не имеет своего объяснения любопытная особенность этого фермента - его специфическим ингибитором является квисквалат.

L-AP4 рецепторы наименее изучены из всех четырех типов ионотропных рецепторов ВАК, что объясняется полным отсутствием агонистов и наличием, по существу, лишь одного специфического антагониста. Можно лишь надеяться, что появление в будущем большого набора соединений, способных проявлять свойства селективных агонистов и антагонистов этого типа рецепторов ВАК, поможет раскрыть молекулярные аспекты функционирования и физиологическую роль рецепторов ВАК L-AP4 типа.

2.6. Метаботропные рецепторы ВАК.

В 1984 году появилось сообщение о том, что глутамат индуцирует хлорные токи в ооцитах лягушек после инъекции мРНК из мозга крысы [Gundersen et al., 1984]. В следующем году было показано сильное стимулирующее действие глутамата и квисквалата на гидролиз фосфоинозитола [Sladeczek et al., 1985]. В других ранних работах на различных моделях было показано, что некоторые агонисты рецепторов ВАК стимулируют гидролиз фосфоинозитидов [Sugiyama et al., 1987].

В результате гидролиза PIP2 образуются инозитил-1,4,5-трифосфат (IP3) и диацилглицерин. IP3 быстро разрушается до I(1,4)P2 или фосфорилируется Ca^{2+} -активируемой IP3-3-киназой до I(1,3,4,5)P4, который, в свою очередь, дифосфорилируется в неактивный изомер I(1,3,4)P3. IP3 стимулирует выброс кальция из внутриклеточных депо [Schoerpp et al., 1991].

Естественно возник вопрос о специфичности рецепторов ВАК, сопряженных с IP. Поначалу казалось, что этот процесс реализуется за счет давно известных рецепторов, чувствительных к квисквалату, так как глутамат и квисквалат индуцировали хлорные токи [Verdoorn, Dingledine, 1988]. Первые сомнения в этом появились после сообщения о том, что joko spider toxin, способный блокировать нейрональные ответы на квисквалат и каинат, не блокировал глутамат-индуцированное образование IP [Sugiyama et al., 1987].

Исследования нового класса рецепторов ВАК на ооцитах дали толчок аналогичным работам с объектами нервной системы млекопитающих. В целом фармакологические особенности процесса индукции квисквалатом оборота IP в головном мозге млекопитающих оказались довольно схожими с таковыми в препаратах ооцитов. В качестве примера можно указать наблюдавшуюся в срезах гиппокампа выраженную стимуляцию образования IP под действием иботената, квисквалата или глутамата [Baudry et al., 1986], а также циклического аналога глутаминовой кислоты транс-1-аминоциклопентил-1,3-дикарбоновой кислоты [(1R,3S)-ACPD]. Стимуляция квисквалатом оборота IP в гранулярных клетках мозжечка, так же как и в ооцитах, тормозилась при инъекции пертуссин токсина [Jackson, Usherwood, 1988].

Наиболее важным выводом этих работ явилось доказательство того, что глутамат-индуцированная стимуляция IP-цикла опосредована квисквалат-чувствительными рецепторами, отличными от известных ранее AMPA рецепторов.

Как на срезах мозга крыс, так и в ооцитах было показано, что сама AMPA не влияет на метаболизм IP, а квисквалат-индуцированное образование IP не устранялось таким AMPA антагонистом как CNQX [Verdoorn, Dingledine, 1988]. Полученные результаты позволили предположить существование в нейронах совершенно иного, нового типа рецепторов ВАР, сопряженных с обменом фосфатидилинозитола, для которых характерны: 1) активация L-глутаматом, иботенатом, квисквалатом и (1R,3S)-ACPD; 2) нечувствительность к действию других агонистов рецепторов ВАР - NMDA, AMPA и каината; 3) отсутствие эффекта антагонистов рецепторов NMDA, AMPA и каинатного типов.

Эти рецепторы получили название "метаботропных", так как их активация проявляется не в изменении проводимости мембраны в результате открытия канала, а в активации внутриклеточного метаболизма.

В настоящее время показано, что метаботропные рецепторы ВАР представляют собой гетерогенную популяцию глутаматных рецепторов, которые вызывают эффекты в клетках через G-белки. Показано, что *in situ* они стимулируют гидролиз фосфоинозитидов, в результате чего образуются диацилглицерин и инозитол-1,4,5-трифосфат, влияют на уровень цАМФ (как понижая, так и повышая его), оказывают модулирующее влияние на различные ионные каналы (например, K^+ и Ca^{2+}) [Winder et al., 1993; Schoepp, Conn, 1993; Littman et al., 1993; Cartmell et al., 1993]. В то время как ионотропные рецепторы ВАР осуществляют быструю синаптическую передачу, метаботропные рецепторы скорее выполняют модуляторные функции и вызывают долговременные изменения в деятельности клетки.

Метаботропные рецепторы ВАР (mGluRs) представляют собой целое семейство, состоящее, как минимум, из семи различных подтипов (mGluR1 - mGluR7) [Masu et al., 1991; Tanabe et al., 1992, 1993; Abe et al., 1992; Nakajima et al., 1993; Okamoto et al., 1994]. Эти рецепторы имеют семь трансмембранных сегментов, похожих на такие же структуры у других рецепторов, связанных с G-белком. Самым существенным их отличием является существование большого N-концевого домена, расположенного вне мембраны снаружи клетки, причем именно в этом домене находится глутамат-связывающий сайт [Takahashi et al., 1993; O'Hara et al., 1993]. Это отличает семейство mGluR от других рецепторов, связанных с G-белком, так как в последних сайт связывания низкомолекулярного лиганда расположен в "трансмембранном кармане".

Семь подтипов метаботропных рецепторов ВАР отличаются друг от друга механизмом передачи сигнала и чувствительностью к действию различных агонистов [Tanabe et al., 1992, 1993; Aramori et al., 1992; Abe et al., 1992; Nakajima et al., 1993; Okamoto et al., 1994]. С учетом аминокислотной последовательности, механизма передачи сигнала и селективности агонистов, семь метаботропных рецепторов можно разделить на три группы: mGluR1/mGluR5, mGluR2/mGluR3 и mGluR4/mGluR6/mGluR7 [Nakanishi, 1992; Nakanishi, Masu, 1990]. Подтипы mGluR1 и mGluR5 связаны с IP_3/Ca^{2+} системой передачи сигнала, для них наиболее сильным агонистом служит квисквалат. Другие пять подтипов ингибируют каскад реакций, связанный с цАМФ. Они также различаются по избирательности действия агонистов: для mGluR1/mGluR5 порядок активности лигандов квисквалат > глутамат > иботенат > 1S,3R-ACPD; для mGluR2/mGluR3 - L-CCG-I [(2S,1'S,2'S)-2-глутамат > иботенат > 1S,3R-ACPD > глутамат = 1S,3R-ACPD > иботенат > (карбоксициклопропил)глицин] > глутамат = 1S,3R-ACPD > иботенат >

квисквалат; а для mGluR4/mGluR6/mGluR7 - L-AP4 > глутамат >>> 1S,3R-ACPD > квисквалат > иботенат [Suzdak et al., 1994, см. также Suzdak et al., 1993].

Активация рецепторов первой группы (mGluR1/mGluR5) приводит к увеличению гидролиза IP3. Рецепторы второй группы (mGluR2/mGluR3) снижают активность аденилатциклазы и уровень цАМФ. Они чувствительны к действию пертуссин-токсина, ингибирующего G-белок. Активация третьей группы рецепторов (mGluR4/mGluR6/mGluR7) также приводит к снижению уровня цАМФ. Они также чувствительны к действию пертуссин-токсина. Каждый из подтипов метаботропных рецепторов имеет уникальное распределение в ЦНС и сетчатке. Рецептор mGluR6 участвует в передаче зрительной информации, передавая сигнал с фоторецепторов на ON-биполярные клетки [Nakanishi et al., 1994]. Другие подтипы широко распространены в различных отделах мозга, что свидетельствует о том, что каждый из подтипов выполняет свою определенную функцию [Tanabe et al., 1992, 1993; Abe et al., 1992; Shigemoto et al., 1992; Ohishi et al., 1993a, 1993b; Okamoto et al., 1994].

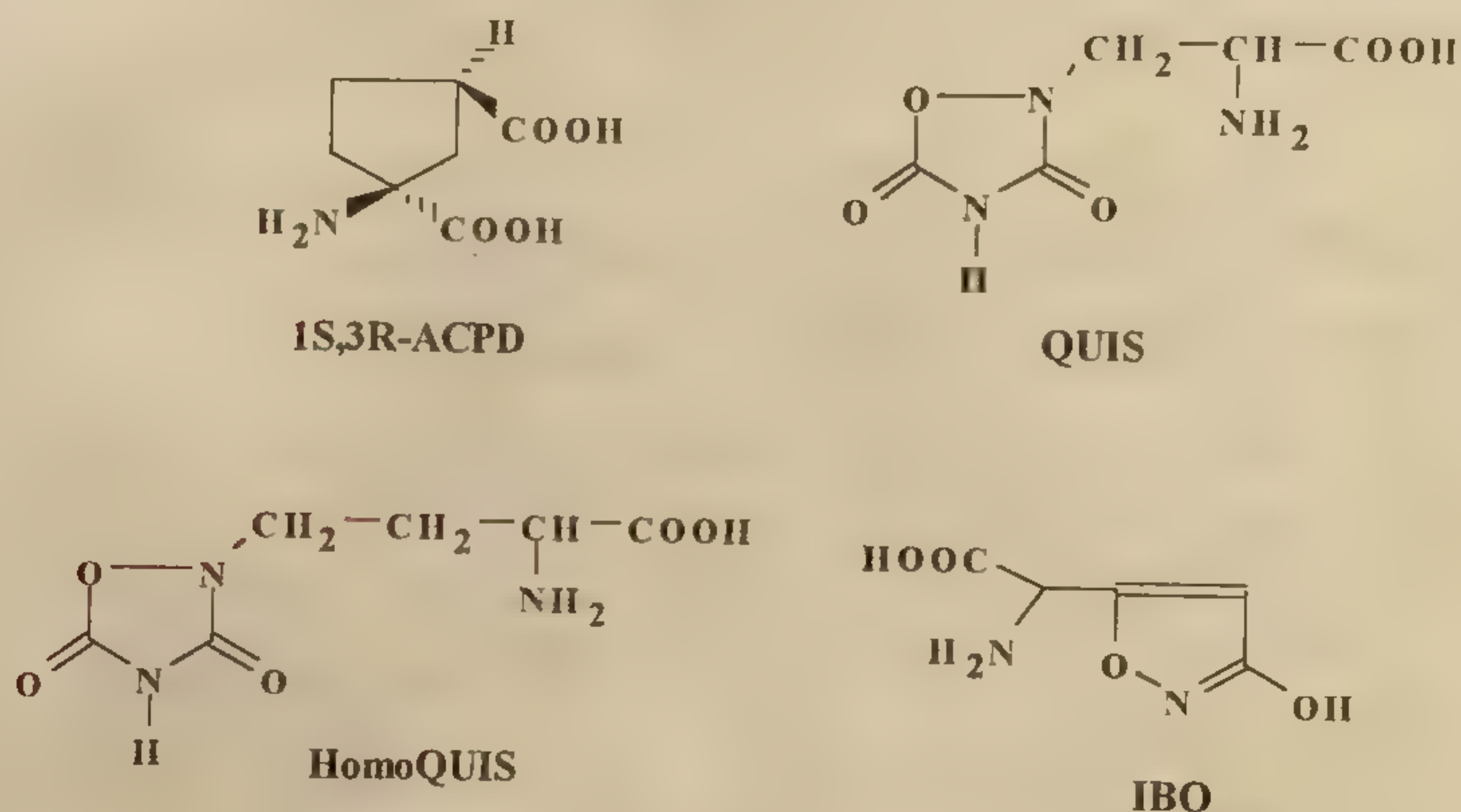


Рис.2.10. Агонисты метаботропных рецепторов

При изучении эффектов активации метаботропных рецепторов ВАР в различных областях ЦНС показано, что эти рецепторы могут быть как пост-, так и пресинаптическими [Baskys, Malenka, 1991]. При действии на последние 1S,3R-ACPD ингибирует выход глутамата-медиатора [Miller, 1994]. В гиппокампе метаботропные рецепторы осуществляют модулирующие функции и вовлечены в процессы синаптической пластичности [Conn, 1994].

Как уже указывалось выше, агонистами метаботропных рецепторов ВАР являются квискваловая, глутаминовая, иботеновая кислоты и 1S,3R-ACPD. Недавно были найдены еще некоторые сильные агонисты этих рецепторов - 3,5-дигидроксифенилглицин и (S)-гомоквискваловая кислота [Porter et al., 1992].

Интересный ряд представляют собой изомерные 2-(карбоксициклопропил)глицины. Всего существует восемь стереоизомеров, отличающихся друг от друга строением хиральных центров. Было показано, что различные изомеры по-разному взаимодействуют с различными подтипами метаботропных рецепторов

[Hayashi et al., 1992]. К агонистам метаботропных рецепторов ВАР, связанных с G-белком, предположительно относят и эндогенный дипептид N-ацетил-аспартилглутаминовую кислоту (NAAG), причем этот дипептид не действует на метаботропные рецепторы, стимулирующие гидролиз инозитилфосфатидов [Wroblewska et al., 1993].

В некоторых работах к антагонистам относят L-AP4, так как была показана ее способность тормозить квисквалат-индуцированный гидролиз инозитилфосфатидов. Некоторыми авторами этот эффект объяснялся идентичностью метаботропных и L-AP4 рецепторов [Nicoletti et al., 1987]. Однако целый ряд других эффектов L-AP4 в различных отделах головного мозга не связан с метаболизмом IP [Monaghan et al., 1989]. Более того, предполагается, что большинство, но не все, эффекты L-AP4 связаны с его агонистическим действием на рецепторы mGluR4 [Kristensen et al., 1993].

К антагонистам метаботропных рецепторов относят AP3. Показано также антагонистическое действие на эти рецепторы таких соединений, как L-SOP, AP5, PDA, γ -DGG, GAMS [Schoepp et al., 1991]. Недавно найдены новые антагонисты - это DL-3-гидрокси-4-карбоксифенилглицин, (RS)- α -метил-4-карбоксифенилглицин и (S)-4-карбоксифенилглицин [Thomsen, Suzdak, 1993; Bashir et al., 1993; Eaton et al., 1993].

Активация NMDA рецепторов тормозит образование фосфатидилинозитола, индуцированное действием агонистов метаботропных рецепторов. В частности, в зависимости от присутствия ионов Ca^{2+} NMDA ингибировала этот процесс в срезах гиппокампа новорожденных крысят. NMDA-агонисты снижали также повышение уровня IP, вызванное стимуляцией M-холинорецепторов в гиппокампе [Baudry et al., 1986]. Тонкие механизмы взаимодействия NMDA рецепторов и метаболизма IP пока еще не изучены. Сначала предполагалось, что агонисты NMDA рецепторов тормозят образование IP за счет нейротоксического эффекта, вызывающего серьезные нарушения внутриклеточного метаболизма [Nicoletti et al., 1996]. Однако появившиеся впоследствии данные о том, что антагонисты NMDA рецепторов усиливают стимулирующее действие L-глутамата на метаболизм IP, позволили усомниться в этом [Kushner et al., 1988].

Известно много работ, в которых показано взаимодействие ионотропных и метаботропных рецепторов ВАР. Сочетанной активации ионотропного AMPA и метаботропного рецепторов отводится важная роль в развитии механической гиперальгезии [Meller et al., 1993], NMDA и метаботропного - в механизмах развития долговременной потенциации в нейронах CA1 гиппокампа крыс [Behnisch, Reymann, 1993; Bashir et al., 1993; Aronica et al., 1993].

О функциональной значимости метаботропных рецепторов ВАР для деятельности мозга известно относительно немного. Предполагается участие этих рецепторов в реализации (или регуляции) процессов роста нервных окончаний. В пользу этого предположения косвенно указывают данные о том, что эффекты различных факторов роста в нервной ткани опосредуются через фосфатидилинозитольный механизм. Кроме того, имеются сведения о быстром снижении активности метаботропных рецепторов после завершения синаптогенеза и об обратном эффекте после деафферентации нервных структур [Nicoletti et al., 1987]. В глутаматергических синапсах синтез белков в постсинапсе регулируется фосфатидилинозитольной системой вторичного мессенджера. Этот механизм лежит, вероятно, в основе влияния этих рецепторов на нейрональную пластичность и возникновение долговременной потенциации [Weiler, Greenough, 1993].

По всей вероятности, метаботропные рецепторы активно участвуют в механизмах синаптогенеза и включаются в механизмы его положительной и

отрицательной регуляции. Как известно, уровень нейрональной активности может определяться балансом между двумя системами вторичных посредников - Ca^{2+} и фосфатидилинозитола. Предполагая совместное существование на постсинаптической мембране NMDA и метаботропных рецепторов, Nicoletti et al. [1996] указывают на следующую возможность модуляции ответа нейрона при его возбуждении эндогенным медиатором: при взаимодействии L-глутамата с метаботропными рецепторами в нервной клетке происходит стимуляция системы фосфатидилинозитола, а при связывании медиатора с NMDA рецепторами инициируется вход ионов Ca^{2+} внутрь клетки и одновременное угнетение фосфатидилинозитольного метаболизма. Было обнаружено, что долговременной потенциации, вызванной активацией NMDA рецепторов, предшествует активация метаботропных рецепторов [O'Connor et al., 1994]. Таким образом, соотношение между внутриклеточными посредниками может определяться активацией обоих типов рецепторов ВАР, что, в конечном итоге, и лежит в основе явления синаптической пластичности.

При активации в стриатуме метаботропного рецептора его агонистами, например 1S,3R-ACPD, может увеличиваться выброс дофамина, что, в свою очередь, приводит к активации D2 рецепторов. Эта роль метаботропных рецепторов в осуществлении экстрапирамидных моторных функций может быть основой для разработки новой стратегии лечения паркинсонизма и хореи Гентингтона [Schoepp, 1994b]. Об участии метаботропных рецепторов в развитии судорожных состояний и нейродегенерации нейронов свидетельствует тот факт, что 1S,3R-ACPD *in vivo* вызывает судороги и повреждения мозга, причем эти эффекты не блокируются антагонистами ионотропных рецепторов ВАР [Sacaan, Schoepp, 1992]. Следовательно, поиск среди лигандов этих рецепторов может привести к новым антиконвульсантам и нейропротекторам [Schoepp, 1994a; Pizzi et al., 1993].

ГЛАВА 3. РЕЦЕПТОРЫ ВАК В ЦНС

Прежде чем перейти к рассмотрению вопроса о локализации рецепторов ВАК в ЦНС в целом и в отдельных ее структурах, остановимся на некоторых методических вопросах изучения этой проблемы. Наиболее распространенными методами являются исследование рецепторного связывания меченых лигандов и автордиографический анализ [Young, Fagg, 1990]. Для анализа распределения данного типа рецепторов обычно используется один из наиболее селективных и активных агонистов. Однако при изучении распределения NMDA рецепторов это оказывается невозможным, так как аффинность меченого лиганда невысока. Поэтому для выявления и сравнительной характеристики NMDA рецепторов в радиолигандных исследованиях обычно применяют меченые антагонисты [Olverman et al., 1984]. Специфическое связывание ^3H -AP5 с синаптическими мембранами мозга ингибируется L-глутаматом, L-гомоцистеатом, L-аспартатом и NMDA, но не квисквалатом, каинатом или L-AP4. Возможно также использование в автордиографических исследованиях и неконкурентных антагонистов. В работе [Maragos et al., 1988], с использованием ^3H -ТСР, лиганда фенциклидиновых сайтов, показано, что локализации NMDA- и фенциклидин-связывающих сайтов в головном мозге крыс очень близки.

Часто в качестве меченого лиганда используется ^3H -L-глутаминовая кислота. Так как это соединение связывается со всеми типами рецепторов ВАК, то для определения доли NMDA рецепторов в общем связывании используется "холодная" NMDA, вытесняющая радиоактивную метку с участков NMDA-специфического связывания. Показано, что в этом случае только агонисты и антагонисты NMDA-рецепторов способны изменять вытеснение ^3H -L-глутамата немеченой NMDA [Greenamyre et al., 1988; Monaghan et al., 1985].

Для изучения анатомической локализации AMPA рецепторов в головном и спинном мозге в качестве меченого лиганда используется ^3H -AMPA, которая с одинаковым успехом может быть использована для работы с мембранными фракциями и для автордиографических исследований. Этот лиганд наиболее активно вытесняется из мест специфического связывания AMPA, квисквалатом и L-глутаматом, слабее каинатом и совсем незначительно - D-глутаматом, D-аспартатом, NMDA, AP5 и L-AP4 [Honore et al., 1988].

Для идентификации каинатных рецепторов используется ^3H -каиновая кислота. Впервые ее специфическое связывание с мембранами мозга описали Simon et al. [1976], указавшие на сильное ингибирование этого связывания L-глутаматом. Однако, по их данным, сам каинат очень слабо вытеснял L-глутамат. Впоследствии было показано, что агонисты NMDA рецепторов (L-аспартат, NMDA и цис-ACPD) не влияют на связывание каината с мембранами мозга крыс, и только агонисты AMPA рецепторов (L-глутамат, квисквалат) проявляют некоторое сродство к каинатным рецепторам [London, Coyle, 1979].

В настоящее время кроме методов радиолигандного анализа для изучения распределения рецепторов широко используются иммунохимический метод. Он позволяет не только устанавливать распределение рецепторов как единых комплексов, но и изучать региональное, клеточное и ультраструктурное распределение отдельных субъединиц рецепторов [Storm-Mathisen, Ottersen, 1991; Huntley et al., 1994].

3.1. Распределение рецепторов ВАК

Перейдем теперь к рассмотрению конкретных фактов. ВАКергическая система, как уже указывалось выше, является основной синаптической системой передачи возбуждения у млекопитающих. Поэтому не удивительно, что ВАКергические нейроны обнаруживаются практически во всех отделах ЦНС [Greenamyre, Porter, 1994]. Особенно высокая их плотность наблюдается во фронтальной коре, гиппокампе, прилежащем ядре и стриатуме, между которыми существуют тесные иерархические связи [Дамбинова, 1989]. Рецепторы ВАК в онтогенезе появляются на относительно поздних стадиях. При изучении распределения подтипов и динамики развития плотности рецепторов в различных областях мозга человеческого плода было показано, что специфическое связывание лигандов рецепторов ВАК появляется на 16 неделе и достигает максимума на 20-21 неделях, то есть в период наивысшей клеточной пластичности. Затем к 24-26 неделям плотность мест связывания лигандов ВАК падает. Количество рецепторных участков связывания L-глутамата в структурах мозга уменьшается в ряду: лобная кора > теменная кора > затылочная кора > полосатое тело > гиппокамп > средний мозг > гипоталамус > мозжечок > продолговатый мозг [Fagg, Foster, 1983; Youong, Petroff, 1991].

NMDA рецепторы. Наибольшая плотность NMDA-чувствительных мест связывания ^3H -L-глутамата была обнаружена в структурах переднего мозга. У крыс максимальная концентрация NMDA-рецепторов характерна для зоны CA1 гиппокампа, в частности для stratum radiatum и stratum oriens. В других областях гиппокампа отмечены: умеренная плотность в зоне CA3, во внутреннем слое зубчатой извилины и низкая плотность в stratum lucidum [Monaghan et al., 1985]. Что касается распределения этих рецепторов в новой коре, то в цитированной выше работе [Monaghan et al., 1985] указывается, что наибольшая плотность NMDA-рецепторов наблюдается в слоях I, II, III и V. Однако в работе [Greenamyre et al., 1987] показано, что максимальное количество этих рецепторов обнаруживается в I, II и IV слоях неокортекса. Если рассматривать кору в топографическом аспекте, то больше всего рецепторов ВАК, чувствительных к NMDA, находится во фронтальном, пириформном, переднем цингулярном и переринальном отделах коры, несколько меньше - в париетальной и энторинальной коре. В базальных ганглиях наибольшая плотность NMDA-рецепторов обнаружена в прилежащем ядре, ядрах ольфакторной системы. В таламусе наибольшее количество этих рецепторов идентифицировано в передне-задних ядрах и некоторых ядрах средней линии (например, ромбовидное), хотя в целом таламические отделы характеризуются средним уровнем глутаматной метки. В большинстве структур среднего мозга и ствола плотность NMDA рецепторов низка, исключение составляют ядра коленчатого тела, дорсомедиальное ядро шва, ядро, ядро солитарного тракта, а также нейроны желатинозной субстанции задних рогов спинного мозга. Мозжечок содержит лишь небольшое количество этих рецепторов, которые в основном сосредоточены в слое гранулярных клеток.

Указанные особенности анатомической локализации NMDA рецепторов были установлены с помощью ^3H -глутамата и подтверждены в дальнейшем ауторадиографическими исследованиями с использованием ^3H -D-AP5 [Monaghan, Cotman, 1985].

AMPA рецепторы. Наибольшая плотность мест специфического связывания ^3H -AMPA в мозге крыс обнаруживается в гиппокампальных пирамидных клетках, в

stratum radiatum CAI и stratum oriens. В коре максимальный уровень связывания регистрируется в слоях I, II и III, несколько ниже в V и VI слоях, и гораздо меньше в IV слое. Среди подкорковых структур можно выделить хвостатое и прилежащее ядра, характеризующиеся повышенной плотностью AMPA рецепторов по сравнению с бледным шаром и безымянной субстанцией. Значительно меньше мест специфического связывания ^3H -AMPA также было обнаружено в структурах среднего мозга и мозгового ствола [Mohaghan, Cotman, 1985]. При сопоставлении анатомической локализации AMPA и NMDA рецепторов в головном мозге крысы можно в целом указать на их значительную схожесть. Некоторые отличия проявляются лишь в том, что высокая плотности AMPA рецепторов обнаруживается в пирамидных клетках гиппокампа, латеральном септуме и в V слое задней коры, что не было отмечено для NMDA-чувствительных мест связывания ^3H -глутамата. И наоборот, в таламусе, слое гранулярных клеток мозжечка обнаружена высокая плотность NMDA рецепторов и довольно низкая - AMPA рецепторов [см также Dure et al., 1992].

Низкая плотность AMPA рецепторов в таламусе установлена и при исследовании распределения субъединиц этих рецепторов в ядрах таламуса методом антипептидных антител [Jose et al., 1996]. Наибольшее количество субъединицы GluR1 обнаружено в интраламинарном и срединном ядрах, тогда как субъединицы GluR2-3 распределены более равномерно. Концентрация GluR4 выше всего в ретикулярном ядре, причем только у взрослых крыс. Иммуноцитохимическое распределение рецепторов неNMDA типа в неокортексе человека изучалось в работе [Vickers et al., 1995]. Детальное региональное, клеточное и ультраструктурное распределение субъединиц GluR2(4) в гиппокампе обезьян приведено в работе [Siegel et al., 1995]. Показано, в частности, что на ультраструктурном уровне иммунореактивность во всех основных областях гиппокампа локализована преимущественно в постсинаптических уплотнениях дендритных шипиков и в соматодендритной цитоплазме. Различия в локализации субъединиц NMDA и AMPA рецепторов в латеральных и базальных ядрах амигдалы см. [Farb et al., 1995].

Каинатные рецепторы. Первые исследования по "картированию" каинатных рецепторов были выполнены в начале 80-х годов автордиографическим методом с использованием ^3H -каината. Самый высокий уровень связывания лиганда был обнаружен в stratum lucidum гиппокампа крысы [Foster et al., 1988; Berger et al., 1995]. Очень высокая плотность каинатных рецепторов была также обнаружена в хвостатом ядре.

В отличие от связывания агонистов с другими типами рецепторов ВАК, уровень специфического связывания каиновой кислоты сильно колеблется в различных участках и слоях коры. Более высокий уровень был обнаружен во фронтальной и переринальной коре, несколько ниже - в участках париетальной, темпоральной и энторинальной зонах. Среди различных слоев неокортекса наибольшая плотность каинатных рецепторов обнаружена в V и VI слоях. В таламусе и гипоталамусе связывание ^3H -каината совпадало с локализацией NMDA рецепторов. В частности, максимальное количество этих типов рецепторов ВАК обнаруживалось в ретикулярном ядре и ядрах средней линии таламуса. Подобное сходство отмечено и для мозжечка, в котором максимальное содержание NMDA и каинатных рецепторов характерно для слоя гранулярных клеток. Довольно высокий уровень связывания ^3H -каината обнаружен в заднем гипофизе и срединном возвышении. Нижние отделы мозга содержат немного каинатных

рецепторов, которые локализуются преимущественно в ядре солитарного тракта, медиальном вестибулярном ядре и в гранулярных клетках заднего кохлеарного ядра. Однако в целом уровень специфического связывания ^3H -каината выше, чем у NMDA, особенно в ядрах ствола. Описанная нами локализация каинатных рецепторов установлена для головного мозга крысы, однако такое же распределение присуще и головному мозгу человека [Tsumoto, 1990].

С использованием селективных антипептидных антител к субъединицам KA2 и GluR6/R7 каинатного рецептора была изучена локализация этих субъединиц в нервной системе крысы [Petrálie et al., 1994]. Концентрация оценивалась по яркости свечения в поле светового микроскопа. Оказалось, что низкий и средний уровень свечения наблюдается во многих структурах мозга, таких как задние рога спинного мозга, вестибулярных ганглиях, а также нейрогипофизе и эпифизе. Средний уровень - в обонятельной луковице, церебральной коре, гипоталамусе, тогда как в большей части таламуса наблюдался низкий уровень. В гиппокампе плотность рецепторов в пирамидных клетках CA3 была выше, нежели в пирамидных клетках CA1, причем эта разница была более заметна с антителами к GluR6/7. В стволе мозга средний уровень наблюдался в некоторых сенсорных, моторных и ретикулярных ядрах. В основном свечение наблюдалось в постсинаптических плотностях. Полученные авторами с помощью обычного микроскопа данные по локализации каинатных рецепторов в основном совпали с данными, полученными ранее радиолигандным методом и гибридизацией *in situ*.

Метаботропные рецепторы. Метаботропные рецепторы широко представлены в нейронах сенсорной системы. Например, рецепторы mGluR6 типа найдены в фоторецепторах и ON-биполярных клетках, в пресинаптических окончаниях гранулярных клеток зрительного бугра, где они модулируют ингибирование ГАМК-передачи с гранулярных на митральные клетки [Nakanishi et al., 1994].

С использованием антител к С-концевому участку белка, входящего в состав mGluR1, установлена его высокая концентрация в нейронах зрительного бугра, stratum oriens CA1 и полиморфном слое зубчатой фасции гиппокампа, бледном шаре, таламусе, черном веществе, верхних ядрах четверохолмия и мозжечке. Меньшая концентрация обнаружена в неокортексе, стриатуме, миндалине и гипоталамусе. Локализации mGluR1 и субъединиц ионотропного AMPA рецептора обычно не совпадают, однако в клетках Пуркинье субъединицы этих двух типов рецепторов располагаются совместно. По мнению авторов, постулируемую физиологическую роль [Birise et al., 1993]. О распределении метаботропных рецепторов ВАР см. также серию работ группы японских авторов под руководством S.Nakanishi [Tanabe et al., 1992, 1993; Abe et al., 1992; Shigemoto et al., 1992; Ohishi et al., 1993a, 1993b; Okamoto et al., 1994].

3.2. Системная организация ВАРгической нейротрансмиссии

Спинной мозг. В ранних работах, посвященных изучению роли возбуждающих аминокислот в регуляции синаптической передачи на уровне спинальных отделов ЦНС, было показано распределение различных подтипов рецепторов в моно- и полисинаптической передаче возбуждающего стимула [Watkins, 1977; 1978]. Предполагалось, что основная доля моносинаптических потенциалов, вызванных с нейронов заднего рога (ранние ответы), опосредуется рецепторами неNMDA типа, в то время как полисинаптические пути (поздние ответы) опосредуются NMDA-чувствительными рецепторными терминалями.

Основой для подобных выводов стала временная оценка ответа, наблюдаемого при стимуляции афферентных волокон.

Однако в последующих исследованиях было установлено, что синаптическая задержка вызванного потенциала в эффекторных клетках ВАКергических нейрональных цепей в наибольшей степени зависит не от количества синаптических терминалей, а от качества (типа) представленных на постсинаптической мембране рецепторов. В работах, выполненных Dale и Roberts (1991) на эмбрионах *Xenopus laevis* впервые были описаны временные характеристики ответа ВАКергических рецепторов. Авторами работы было установлено, что локальная стимуляция афферентных волокон или внутриклеточная стимуляция интернейрона приводит к появлению трех типов ответа. Наиболее частым из них был поздний ВПСР (время нарастания 22 мс), более редким был ранний ВПСР (время нарастания 3 мс) и третий тип ответа представлял собой алгебраическую сумму раннего и позднего компонентов. Фармакологическая оценка участия различных подтипов рецепторов в развитии ВПСР позволила установить прямую связь раннего ВПСР с рецепторами AMPA типа и, соответственно, позднего ответа с NMDA рецептором [Long, Tivans, 1988; Jahr et al., 1994].

Эти данные заставили пересмотреть результаты нейрофизиологических исследований и показали возможность участия обоих подтипов рецепторов ВАК как в моно-, так и в полисинаптических нейрональных цепях, регулирующих синаптическую передачу в спинном мозге.

Подкорковые ядерные структуры. Таламус. Предположение о присутствии рецепторов ВАК в структурах таламуса первоначально основывалось на наблюдениях эффективности блокирующего действия ДЭЭГ и DL-метилглутамата на возбуждение клеток вентробазального ядра в ответ на стимуляцию афферентных волокон. В последующих экспериментах с внутриклеточной регистрацией потенциала было показано блокирующее действие кинуреновой кислоты, но не AP5 [Salt et al., 1986a; 1986b]. Однако с помощью тетанической стимуляции афферентных волокон (20 Гц) была установлена возможность активации NMDA-рецепторных структур, что позволило высказать предположение об участии NMDA-рецепторов вентробазального ядра таламуса, подобно дорсальным ганглиям спинного мозга, в восприятии ноцицептивных раздражений [Salt et al., 1988]. Kemp и соавт. (1993) установили, что антагонисты NMDA рецепторов AP5 и HA-966 (но не ДЭЭГ и CNQX) подавляли вызванный раздражением проекций X и Y нейронов латерального коленчатого ядра спайковый разряд. В работе показана неэффективность атропина в подавлении вызванных ответов в данной структуре, что опровергает ранее полученные данные [Tebecis, 1973] об участии холинергических нейронов в передаче нервного сигнала в латеральном коленчатом ядре.

В целом следует отметить, что данные о представительстве рецепторов AMPA в таламических ядрах очень малочисленны и противоречивы, что объясняется, по всей видимости, их незначительной ролью в данном регионе мозга [Spreafico et al., 1994].

Стриатум и мезенцефальные ядра. Большинство афферентных проекций стриатума имеют источник в кортикальных структурах большого мозга. В работе [Stone, 1979] сообщается, что D-2-аминоадипиновая кислота подавляет афферентную импульсацию кортикальных эфферентов на нейроны стриатума. В дальнейших исследованиях была подтверждена неNMDA рецепторная природа этих ответов [Herrling, 1985; 1989].

Внутриклеточная регистрация клеточного потенциала позволила установить эффективность блокады вызванных потенциалов при низкочастотной стимуляции антагонистами рецепторов mGABA_A типа, в то время как D-AP5 -чувствительный компонент проявлялся, подобно гиппокампальным проекциям, при деполяризации нейрона ниже 50 мВ, либо в среде, обедненной ионами магния.

Черное вещество. Стимуляция стриатных нейронов вызывает одновременно появление в клетках черного вещества возбуждающего (ВАКергического) и тормозного (ГАМКергического) потенциалов [Collingridge, Davies 1981]. Возбуждающий потенциал при регистрации низкочастотного (1-2 Гц) раздражения нечувствителен к действию AP5 и D-2-аминоадипината [Collingridge, Davis 1989b]. Пока не установлена возможность и условия активации NMDA-рецепторных структур, хотя, по всей видимости, механизм их ответа будет соответствовать реакции ВАКергических нейронов других регионов мозга.

Субталамическое ядро. Однократное сверхпороговое раздражение корковых структур приводит к развитию эпилептиформной спайковой активности субталамического ядра. Показана связь этого ответа с активацией рецепторов AMPA (так как ДЭЭГ блокировал эффект), но не NMDA типа [Clements, 1996].

Прилежащее ядро. Большинство исследователей рассматривает данную структуру мозга как лимбико-моторный интерфейс, опосредующий выраженность и направленность поведенческих реакций в зависимости от модальности эмоциональной реакции организма. Показано, что глутаматергическая и дофаминергическая медиаторные системы являются основными в прилежащем ядре. Именно их взаимодействие определяет качественные и количественные характеристики ответа. Предполагается, что прилежащее ядро участвует в интеграции поступающей по глутаматергическим входам информации из гиппокампа (субикулума) и трансформации ее, после передачи в область субпаллидума, в моторный ответ [Aragam, Lodge 1988]. Таким образом прилежащее ядро выступает в роли стратегического транслятора акцептора действия в поведенческом акте (рис.3.1).

Перегородка. Установлено существование прямых глутаматергических проекций в латеральный септум из гиппокампа. Ионотопическое подведение в эту зону ДЭЭГ (но не D-AP5) приводит к подавлению вызванных ответов. Аналогичные данные были получены при внутриклеточной регистрации потенциала нейронов латерального септума при введении кинуреновой кислоты [Stevens, Cotman 1986], что свидетельствует о преимущественном расположении в этой зоне AMPA рецепторов. В целом следует отметить, что представительство различных типов рецепторов ВАК в данном регионе мозга мало отличается от их распределения в зоне CA1 гиппокампа, так как обе структуры получают афферентацию с одних и тех же нейронов зоны CA3.

Ствол мозга. N.cuneatus одним из первых было описано в качестве объекта глутаматергической регуляции. Davies и Watkins [1983], а затем Stone [1979] показали на анестезированных уретаном крысах, что ионотопическое подведение НА-966 снижает возбудимость нейронов этого ядра, вызванное стимуляцией восходящих и кортикофугальных афферентных входов. Аналогичные данные были получены при раздражении афферентов ядра тройничного нерва (аналог ядер дорсального отдела столба Кларка).

Hill и Salt [1982] показали эффективность подавления ответов различной модальности в этом ядре при аппликации D-2-аминоадипата. Вестибулярные ядра, взаимодействующие с афферентными волокнами интернейронов контрлатерального лабиринта, входящих в состав VIII пары черепно-мозговых нервов, также находятся под глутаматергическим контролем. Первоначально было

показано участие в передаче нервного стимула как NMDA, так и AMPA рецепторов [Jackson et al., 1985; Martin, 1985]. Впоследствии, с использованием методов внутриклеточной регистрации потенциала Cochran и соавт. [1987] удалось установить наличие раннего (неNMDA зависимого) и позднего (NMDA-зависимого) компонентов ответов, вызываемых преимущественно с ипси- и контралатеральных ядер соответственно [Knopfel 1987].

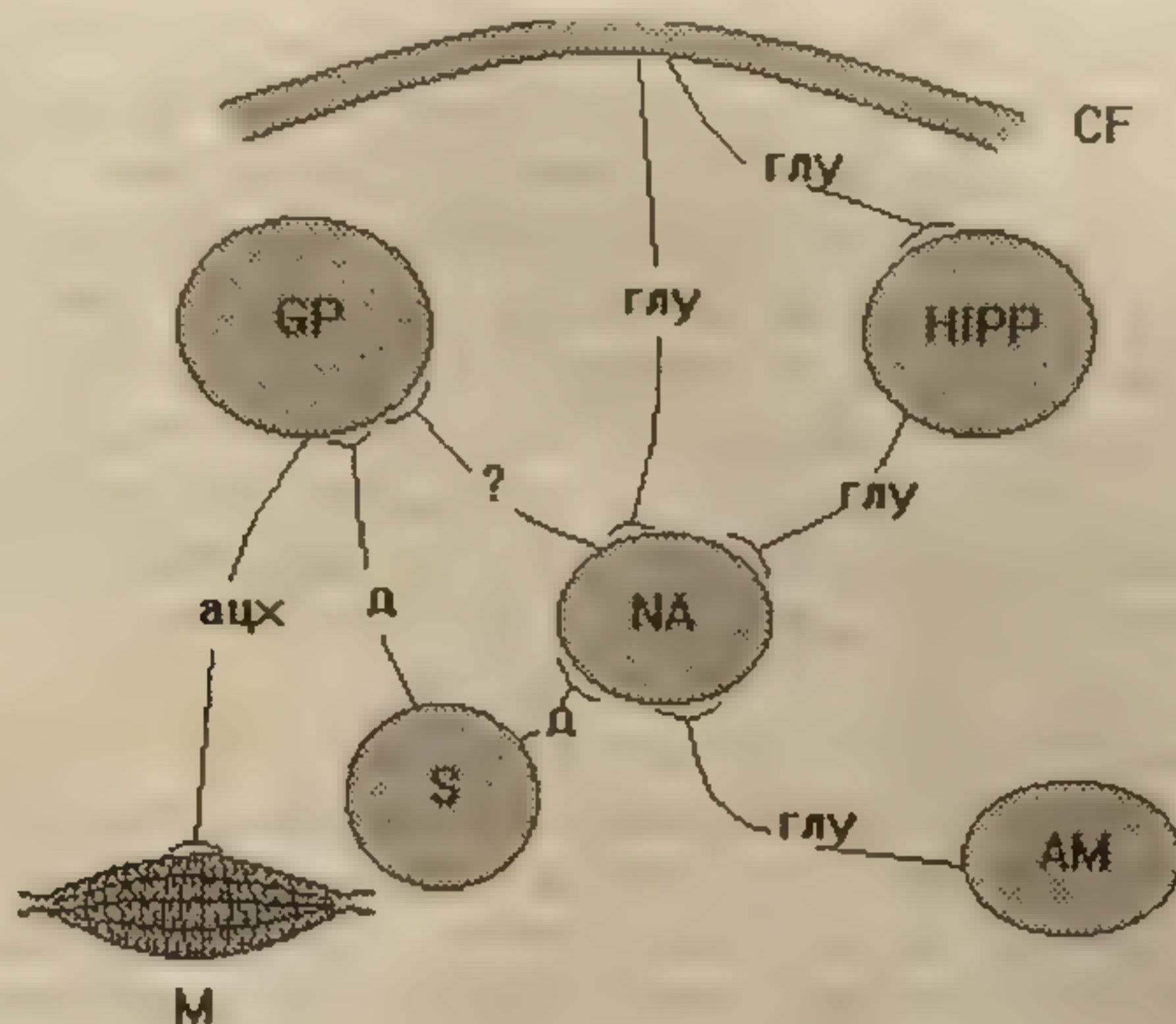


Рис.3.1 Взаимодействие глутаматергической и других нейромедиаторных систем в регуляции поведенческого акта. Условные обозначения: CF - фронтальная кора; GP - бледный шар; HIPP - гиппокамп; NA - прилежащее ядро; S - стриатум; AM - миндалина; М - мышца. Медиаторная принадлежность афферентных волокон: глу - глутаматергические; д - дофаминаргические; ацх - холинергические. Объяснения в тексте.

Имеются данные об участии ядра солитарного тракта в регуляции кардиоваскулярной деятельности. Использование техники микроинъекций антагонистов рецепторов ВАК показало возможность подавления барорефлекторных ответов, замыкаемых через это ядро. Так, введение в ядро кинуреновой кислоты и AP5 приводило к развитию брадикардии и гипотензии [Guinet, Filts 1987; Kubo, Kihara 1988], что подтверждает участие в этих процессах обоих подтипов глутаматных рецепторов.

Мозжечок. Большое количество работ посвящено исследованию ВАКергической регуляции двигательных и вестибулярных реакций в мозжечке и связанных с ним структурах. Наиболее изученными ВАКергическими проекциями являются афференты клеток Пуркинье, к которым относятся параллельные, лазающие и мшистые волокна.

Параллельные волокна обеспечивают основной возбуждающий вход с гранулярных нейронов на клетки Пуркинье. Многочисленными исследованиями было установлено преимущественное участие в нейротрансмиссии рецепторов AMPA типа. На нейрональных срезах и культуре гранулярных клеток мозжечка кролика было показано, что ионофоретическое подведение ДЭЭГ и кинуреновой кислоты, но не AP5, подавляет синаптическую передачу на этом пути [Kano, Kato 1987; 1988],

в то время как отсутствие в инкубационной среде ионов магния не влияло на выраженность ответа клеток Пуркинье [Hirano, Nagiwaга 1988].

Лазящие волокна представляют собой проекции нейронов нижней оливы на дендриты клеток Пуркинье. На срезах мозжечка морской свинки Kimura и соавт. [1985] показана высокая чувствительность этих путей к ингибирующему действию AP5 и, в значительно меньшей степени, к ДЭЭГ, что свидетельствует о преимущественном участии в синаптической передаче в этом регионе рецепторов NMDA типа.

Мшистые волокна. В отличие от лазящих волокон, иннервируемые аксонами мшистых волокон нейроны содержат на постсинаптической мембране преимущественно терминали неNMDA типа. Исследованиями Garthwaite и соавт. [1986; 1989] показано ингибирующее влияние CNQX на спайковую активность, в то время как D-AP5 был неэффективен на данной модели. Лишь при высокочастотной стимуляции (100 Гц) мшистых волокон в безмагниевой среде установлена возможность активации NMDA-рецепторного комплекса. Большая плотность NMDA рецепторов установлена на препаратах молодых животных, что подтверждает установленное ранее правило о высокой их значимости в регуляции процессов развития нервной ткани в период раннего онтогенеза.

Гиппокампальная формация. В первых работах, посвященных изучению нейрохимической организации гиппокампальной формации (ГФ) височной доли мозга, было установлено наличие неизвестных в то время цинксодержащих синапсом, идентифицированных позднее как глутаматергические. В настоящее время доказано, что более 70 процентов синаптической передачи ГФ находится под контролем ВАК. Данная медиаторная система, благодаря своим уникальным нейрофизиологическим особенностям, определяет ключевую роль гиппокампа в механизмах нейрональной пластичности, фиксации индивидуального опыта, эмоциональной реактивности, судорожной готовности, оценке размерности временной шкалы и т.д. [Balster et al., 1992].

Использование тонких нейрофизиологических, гистохимических, радиолигандных методов позволило установить особенности структуры и функции ВАКергических проекций ГФ. Выделяют три основных глутаматергических афферентных входа в ГФ: а) медиальный и латеральный пучки перфорантного пути (энторинальная кора - гранулярные клетки зубчатой фасции с минорными проекциями в СА3 и СА1 гиппокампа); б) мшистые волокна (гранулярные клетки зубчатой фасции - проксимальные апикальные дендриты stratum lucidum СА3 пирамидных нейронов); в) коллатерали Шаффера (нейроны СА3 - пирамидные клетки СА1; основные волокна этих нейронов оканчиваются на нейронах ипси- и контралатеральных СА3 зон гиппокампа) [Barrionuevo et al., 1986; Jack et al., 1971; Johnston et al., 1992].

Оценка распределения подтипов глутаматных рецепторов не выявила существенных различий в их представительстве в различных регионах ГФ. По слоям показано преимущественное расположение рецепторов AMPA/NMDA типа в stratum radiale, в то время как каинатные рецепторы находятся в основном в молекулярном слое зубчатой извилины и stratum lucidum зоны СА3 гиппокампа [Lee, Choi 1992]. В ряде работ было показано, что солокализация обоих подтипов рецепторов является необходимым условием поддержания нормального функционального состояния нервных клеток [Jay et al., 1992; Crunelly V. et al., 1982].

Рецепторный ансамбль, представленный NMDA, AMPA и, в меньшей степени, метаботропным рецепторами является, по-сути, единым функционально связанным

надрецепторным комплексом, определяющим не только качественные, но и количественные градации ответа нейрона на поступающую информацию. Наличие подобной функциональной связи не является уникальным и применимо к другим медиаторным системам мозга, однако, для ВАКергических нейронов оно намного более значимо, ибо определяет их ключевую роль в процессах обработки и фиксации сенсорных сигналов любой модальности и знака, в особенности на уровне гиппокампальной формации и надмезенцефальных структур.

Неокортекс. Большое количество работ посвящено изучению роли глутаматергических нейронов в осуществлении высших интегративных функций новой коры. Проведенные исследования позволяют говорить о широком представительстве в этой области мозга ВАКергических нейронов, осуществляющих путем сложного иерархического взаимодействия афферентных, кортикофугальных и внутрикорковых проекций процессы переработки и сохранения поступающей информации. Общие принципы синаптической организации ВАКергической нейротрансмиссии в неокортексе и гиппокампе весьма похожи. Однако, функциональное значение взаимодействия нейрональных ансамблей, ввиду их многообразия, морфологической и функциональной полиморфности, до настоящего времени остается малоизученным. Поэтому мы уделим основное внимание изложению накопленного фактического материала, позволяющего составить общее впечатление о состоянии проблемы.

Обонятельная зона. Детальный анализ результатов нейрофизиологических исследований по качественному и количественному изучению ответов ВАК-чувствительных нейронов обонятельной коры проводится в обзоре [Collins et al., 1982]. Сообщается, что подобно гиппокампальным нейронам, низкочастотная электрическая стимуляция латерального обонятельного тракта приводит к AMPA-зависимой активации ответов клеток коры, в то время как NMDA-зависимые ответы проявляются лишь при высокочастотной стимуляции или при добавлении в среду пикротоксина. Предполагается, что нейроны фазического типа (с регулярной спайковой активностью) определяют функционирование клеток в нормальных условиях, в то время как тетаническая импульсация или блокада ингибиторных влияний приводит к переходу клеток в эпилептиформное состояние, характеризующееся нерегулярной пачечной (взрывной) активностью и опосредуемое активацией рецепторов NMDA типа. Установлена возможность регуляции афферентного потока через пресинаптическое звено [Hearn et al., 1986; Nori et al., 1991]. Предполагается наличие на пресинаптической мембране аксонов латерального обонятельного тракта NMDA, каинатных, L-AP4, но не квисквалатных рецепторов.

Цингулярная и сенсомоторная зона. В работе Stone и соавт. [1979] приводятся убедительные доказательства участия ВАКергических терминалей в процессах возбуждения эффекторных нейронов конвекситальной коры при раздражении афферентов пирамидного тракта.

Аналогичные данные были получены при активации таламокортикальных проекции в сенсомоторную кору [Addae, Stone, 1987]. В работах на коронарных срезах мозга Thompson и колл. [1985; 1986] удалось установить рецепторную принадлежность вызываемых во II- III корковых слоях разрядов. Аналогичные данные были получены в работе [Лебедев, 1986] на нейронах V слоя. Авторами работ было доказано существование на пирамидных клетках обоих подтипов глутаматных рецепторов, однако длинный латентный период AP5-чувствительного ответа свидетельствует о его полисинаптической природе и проявляется, по всей видимости, при активации глутаматергических внутрикорковых интернейронов IV

слоя коры [Sutor, Hablitz 1989], в то время как коротколатентные ответы АМРА рецепторов являются результатом прямой активации афферентных волокон.

Изучение роли NMDA-рецепции в передаче сенсорной информации, проведенное Artola и Singer [1987] путем внутриклеточной регистрации потенциалов нейрона, позволила установить, что NMDA рецепторы лишь в незначительной степени определяют выраженность ВПСР (в режиме регулярной спайковой активности). Однако, в клетках с характерными для эпилептиформных разрядов пачечными ответами этот тип рецепторов превалировал. В этой связи следует отметить, что, подобно другим регионам мозга, в соматосенсорной коре существует частотная зависимость рецепторного ответа и возможность перехода при тетанической стимуляции клеток фазического типа в состояние эпилептиформной активности [Aram, Lodge 1988; 1989].

Зрительная зона. Hicks et al. [1981] показали существование в супрасильвиевой зрительной зоне (Clare-Bishop) глутаматчувствительных нейронов. Ионотропическое подведение AP5 при локальном раздражении аналогичной зоны мозга противоположного полушария приводило к подавлению вызванных ответов. В наибольшей степени чувствительными к действию NMDA антагонистов были клетки IVa и верхней части VI слоев коры [Tsumoto et al., 1986]. Следует отметить установленный в экспериментах факт синергичного подавления ответов при аппликации AP5 и атропина, что свидетельствует о существенной роли взаимодействия ВАР и холинергической систем в восприятии зрительной информации.

Энторинальная зона. Имеются данные о регистрации вызванной спайковой активности в IV/V слоях энторинальной коры при активации субикулума в комбинированных срезах коры и гиппокампа [Jones, 1995]. Ответы носили характер медленных, усиливались в среде, обедненной ионами магния, в значительной степени подавлялись в присутствии AP5, что свидетельствует о связи их с активацией NMDA рецепторов. Длительная тетаническая стимуляция приводила к переходу ВПСР к отчетливо выраженной эпилептиформной активности [Walther et al., 1986].

ГЛАВА 4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВАКЕРГИЧЕСКОЙ И ДРУГИХ МЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ

Взаимодействие различных медиаторных систем определяет функционирование центральной нервной системы как единого целого. Этот раздел нейрофизиологии - один из наиболее сложных и малоразработанных. Не претендуя на полный охват накопленного за последние годы экспериментального материала, в настоящей главе остановим свое внимание на некоторых, на наш взгляд, наиболее важных и интересных аспектах, позволяющих глубже понять роль ВАКергической медиаторной системы в ЦНС.

4.1. Дофаминергическая система.

Большое число работ посвящено исследованию взаимодействия дофаминергической и ВАРгической систем в стриатуме и функционально сопряженных с ним структурах.

Существуют два основных афферентных входа в стриатум: нигростриатный, имеющий дофаминергическую природу, и кортикостриатный, представленный аксонами ВАКергических нейронов коры (рис.4.1). Установлено, что локальное введение ДА и его агонистов приводит к подавлению K^+ индуцированного выброса глутамата на срезах стриатума [Mitchell, Dogget, 1980], высокоаффинного обратного захвата медиатора [Nieoullon et al., 1982] и выброса его из стриатных синапсов [Dodhukin et al., 1984].

Предполагается существование нескольких путей модуляции выброса медиатора из ВАКергических терминалей дофамином. По мнению одних авторов, основную роль играют D2 гетерорецепторы, расположенные на пресинаптической мембране кортикостриатных аксонов [Kerkerian, Nieoullon, 1988; Filloux et al., 1988]. По мнению других, взаимодействие осуществляется при участии интернейрональных ГАМК- и, возможно, серотонинергических цепей [Westerink et al., 1992]. В свою очередь глутаминовая кислота также является активным стимулятором выброса дофамина из синапсом стриатума.

В исследованиях с использованием микродиализной техники было показано активирующее влияние глутамата и его аналогов на выброс дофамина в стриатуме, сочетающееся с увеличением спайковой активности дофаминергических нейронов ядер среднего мозга [Svensson et al., 1992]. Так, введение агонистов рецепторов ВАК-агонистов (NMDA, AMPA, каинат) в микродиализные канюли в стриатуме и черной субстанции приводит к увеличению выброса дофамина. Наиболее эффективными на данной модели оказались каинат и AMPA [Westerink et al., 1992].

Анализ полученных данных позволил предположить существование двух механизмов регуляции выброса дофамина: как пресинаптического (ТТХ-зависимого и не зависящего от разрушения нейронов иботеновой кислотой; более характерного для каината), так и постсинаптического (низкие дозы веществ, увеличение внутриклеточного содержания кальция). Некоторые авторы высказывают предположение об осуществлении глутаматергической системой фазического (стимулирующего) и тонического (ингибирующего) влияния на выброс медиатора [Svenson et al., 1992]. Аналогичные результаты были получены Youngren и соавт. [1993] на нейронах прилежащего ядра, относимого, по мнению многих авторов, к структурам переднего стриатума. Показана дозозависимая активация выброса ДА в прилежащем ядре при введении аспартата и, в меньшей степени, глутамата. Установленное подавление эффекта под действием ТТХ свидетельствует о не прямой регуляции ответа эффекторных дофаминергических

нейронов, осуществляемое либо через пресинаптическое звено, либо через систему вставочных интернейронов.

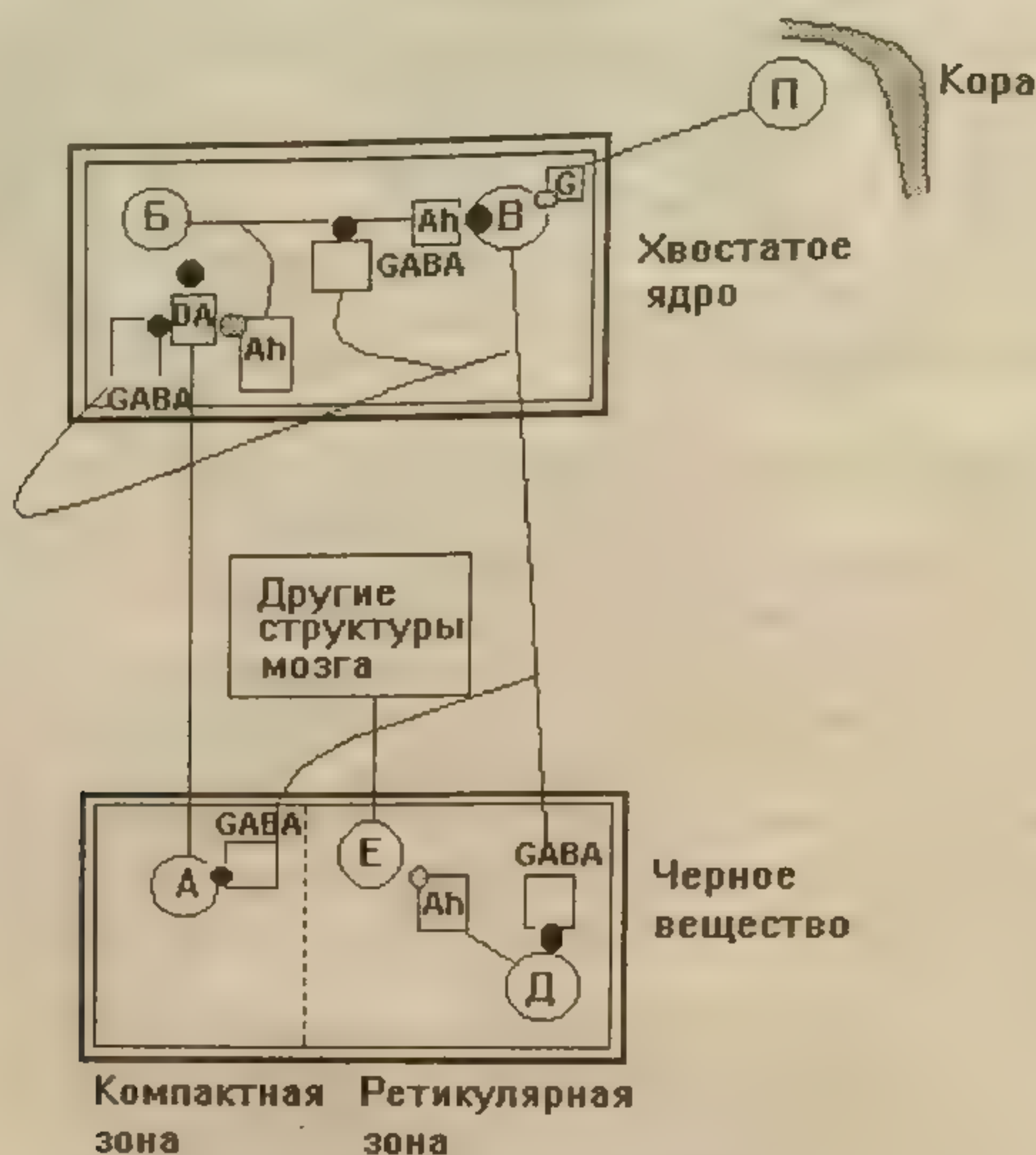


Рис. 4.1 Схема взаимодействия медиаторных систем в хвостатом ядре и черном веществе. Стимуляция ДА рецепторов полосатого тела из окончаний ДАергического нейрона (А), локализованного в компактной зоне черного вещества, ингибирует ГАМКергический нейрон (В), посылающей аксоны ретикулярной зоне черного вещества. Нейрон В активируется глутаматом, идущим из нейрона Г коры мозга, так что стимуляция ДАергических рецепторов полосатого тела ведет к усилению обмена ГАМК в черном веществе. Нейрон В ингибирует холинергические вставочные нейроны Д. Ингибирование за счет активации ГАМКергической системы в ретикулярной зоне черного вещества (Е) воспроизводит эффект стимуляции ДА рецепторов в полосатом теле (Раевский, Георгиев, 1986).

Изучению функционального взаимодействия между ВАКергической и дофаминергической системами в стриатуме посвящена работа [Amalric et al., 1994]. При изучении модуляции дофамином синаптической передачи в префронтальной коре было показано, что дофамин отчетливо снижает все компоненты синаптического ответа, вызванного электрической стимуляцией I и VI слоев. Особенно это относится к моносинаптическому ВПСР, возникающему в результате активации ВАКергических рецепторов. При этом дофамин одинаково уменьшает как NMDA, так и AMPA компоненты моносинаптического ВПСР. Ингибирующий эффект дофамина на ВАКергическую передачу частично воспроизводится только агонистом D₁ рецепторов SKF 38393, но не агонистом D₂ рецепторов квинпиролом. Соответственно, этот эффект дофамина снимается введением блокатора D₁ рецепторов SCH 23390, но не сульпиридом, антагонистом D₂ рецепторов.

Следовательно, ослабление ВАКергической передачи под действием дофамина связано с активацией рецепторов D_1 типа [Law-Tho D. et al., 1994].

При изучении влияния антагонистов АМРА/каинатных рецепторов - DNQX и GAMS на выраженность действия амфетамина, стимулирующего моторную активность, было показано, что увеличение двигательной активности, вызванное активацией дофаминовых рецепторов в прилежащем ядре и вентральном паллидуме, усиливается при стимуляции глутаматергических афферентов неокортекса и лимбических структур. Инъекции DNQX и GAMS в прилежащее ядро блокируют эффект амфетамина [Willins et al., 1992].

Выявлено синергичное действие дизоцилина и смешанного D_1/D_2 агониста апоморфина при введении последнего в субпороговых дозах [Svensson et al., 1992].

Классической моделью по изучению механизмов дофаминовой регуляции в базальных ганглиях является болезнь Паркинсона. Известно, что дофамин оказывает модулирующее влияние на выброс ацетилхолина на шипиковых нейронах хвостатого ядра, образующих основной выход на нейроны паллидума. Показано, что стимуляция D_2 рецепторов этих клеток приводит к прямой активации выброса ацетилхолина, в то время как активация D_1 рецепторов ведет к непрямому облегчению выброса медиатора, действуя транссинаптически. Дефицит выброса дофамина приводит к усилению тонической активности холинергических проекций и развитию дефицитарных моторных расстройств. В исследованиях Le Moine и соавт. [1991] предполагается возможность регуляции выброса дофамина посредством активации кортикостриатных глутаматергических проекций. Известны данные, свидетельствующие о тоническом влиянии глутаматергической системы на дофаминергические нейроны [Di Chiara, Morelli, 1993; Morelli et al., 1992].

Важная роль глутаматергической системы в регуляции дофаминергической передачи определяет ее значение в развитии психотических и депрессивных расстройств. Неполное соответствие дофаминовой теории шизофрении и терапии ее нейролептиками привело к мысли об участии в развитии данного психического расстройства и других медиаторных систем.

Широкое использование в клинике атипичных нейролептиков позволило по-иному взглянуть на механизмы развития и лекарственной коррекции психотических состояний [Bardgett et al., 1993]. Как известно, разделение нейролептиков на типичные и атипичные основано на их способности вызывать нарушения двигательной сферы, характерные для паркинсонических расстройств. Установлено, что антипсихотический эффект типичных нейролептиков связан с блокадой мезолимбических D_2 ауторецепторов, в то время как их неврологические побочные эффекты вызваны блокадой нигростриатных D_2 рецепторных структур [Seeman, 1980]. Атипичные нейролептики, у которых отсутствует негативная неврологическая симптоматика, осуществляют свое действие через преимущественный антагонизм с D_2 рецепторами мезолимбического отдела мозга и/или через другие механизмы (серотониновый) [Meltzer, 1990]. В современной литературе имеются лишь единичные наблюдения о влиянии типичных и атипичных нейролептиков на ВАКергическую нейротранс передачу в мезолимбическом и нигростриатном регионах.

Результаты исследований влияния атипичных нейролептиков: клозапина (смешанный $D_2/5\text{-HT}_2$ антагонист), (-)-3-PPP (частичный D_2 агонист), L-сульпирида (смешанный D_2/D_3 антагонист) и галоперидола на выброс глутамата в мезолимбическом (прилежащее ядро) и нигростриатном регионах позволили установить, что при однократном введении атипичные нейролептики снижают уровень глутамата в прилежащем ядре на 18-42%, в то время как галоперидол не

оказывает выраженного эффекта. Среди вероятных механизмов предполагается существование прямой модуляции NMDA рецепторов клозапином [Freed et al., 1993]. Другой возможный путь - блокирование клозапином 5HT₂ рецепторов. Представленные результаты позволяют предположить возможное участие ВАКергической системы мозга в реализации эффектов этих препаратов. Снижение под влияние атипичных нейролептиков уровня глутамата в прилежащем ядре может объяснять их эффективность у рефрактерных к терапии больных, а неспособность атипичных нейролептиков увеличивать уровень глутамата в стриатуме помогает объяснить отсутствие у них острых экстрапирамидных побочных расстройств, характерных для типичных нейролептиков.

В исследованиях, посвященных анализу роли подтипов дофаминовых рецепторов, показано, что локомоторная стимуляция D₁ агонистом SKF 38393 на фоне опустошения депо моноаминов потенцировалась введением дизоцилпина, в то время как эффекты D₂ агонистов - квинпирила и бромкриптина снижались при его введении. Эффект SKF 38393 блокировался D₁ антагонистом SCH 23390, а эффект квинпирила блокировался D₂ антагонистами раклопридом и галоперидолом, что подтверждает специфичность механизмов их действия [Freed, 1989]. Приведенные результаты согласуются с данными, полученными Goodwin и соавт. [1989] на той же модели и Morelli and Di Chiara [1990] на модели с введением 6-гидроксидофамина. В работе Svensson et al. [1992] показано, что у мышей с опустошенными депо локальное введение D-AP5 в прилежащее ядро приводит к контралатеральным вращениям при системном введении SKF 38393 и ипсилатеральным вращениям при введении квинпирила.

В работе Freed [1989] излагается гипотеза о роли взаимодействия дофамин- и ВАКергической модуляции холинергических нейронов стриатума при развитии психоза и его купировании. По мнению авторов механизм развития психоза очень близок к проявлениям гиперподвижности, вызванных стимуляцией ДА рецепторов. Предполагается, что избыточное выделение ДА, приводящее к подавлению активности холинергических нейронов хвостатого ядра, вызывает активацию эффекторных нейронов бледного шара и соответствующие двигательные и психотические реакции.

Структура психотической реакции и ее механизм, несомненно, сложнее простого межмедиаторного взаимодействия на уровне стриатума, однако это звено является одним из главных. Окончательное оформление эмоциональной реакции в психотическую происходит, видимо, в сенсомоторных зонах коры. Однако для ее реализации требуется ослабление коркового контроля над структурами стриатума, что и наблюдается при психозе. Гипотеза автора состоит из следующих постулатов: 1) кортико-стриатные ВАКергические афференты играют определяющую роль при развитии психоза; 2) однократное введение нейролептиков приводит к блокаде дофаминовых рецепторов и вызывает седацию без существенного антипсихотического действия; 3) длительное назначение нейролептиков приводит к увеличению чувствительности и числа рецепторов дофамина и снижению седативного компонента нейролептиков; 4) длительное применение нейролептиков приводит также к снижению чувствительности и числа рецепторов ВАК. Именно это, по мнению авторов, и вызывает снижение эффективности терапии при хроническом их введении (рис.4.2).

Экспериментальным обоснованием представленной гипотезы могут служить следующие наблюдения: введение в стриатум 6-гидроксидофамина приводит к снижению количества рецепторов ВАК на 40%. [Bouyer et al., 1984]; декортикация приводит к снижению связывания меченого галоперидола в стриатуме на 40-50%

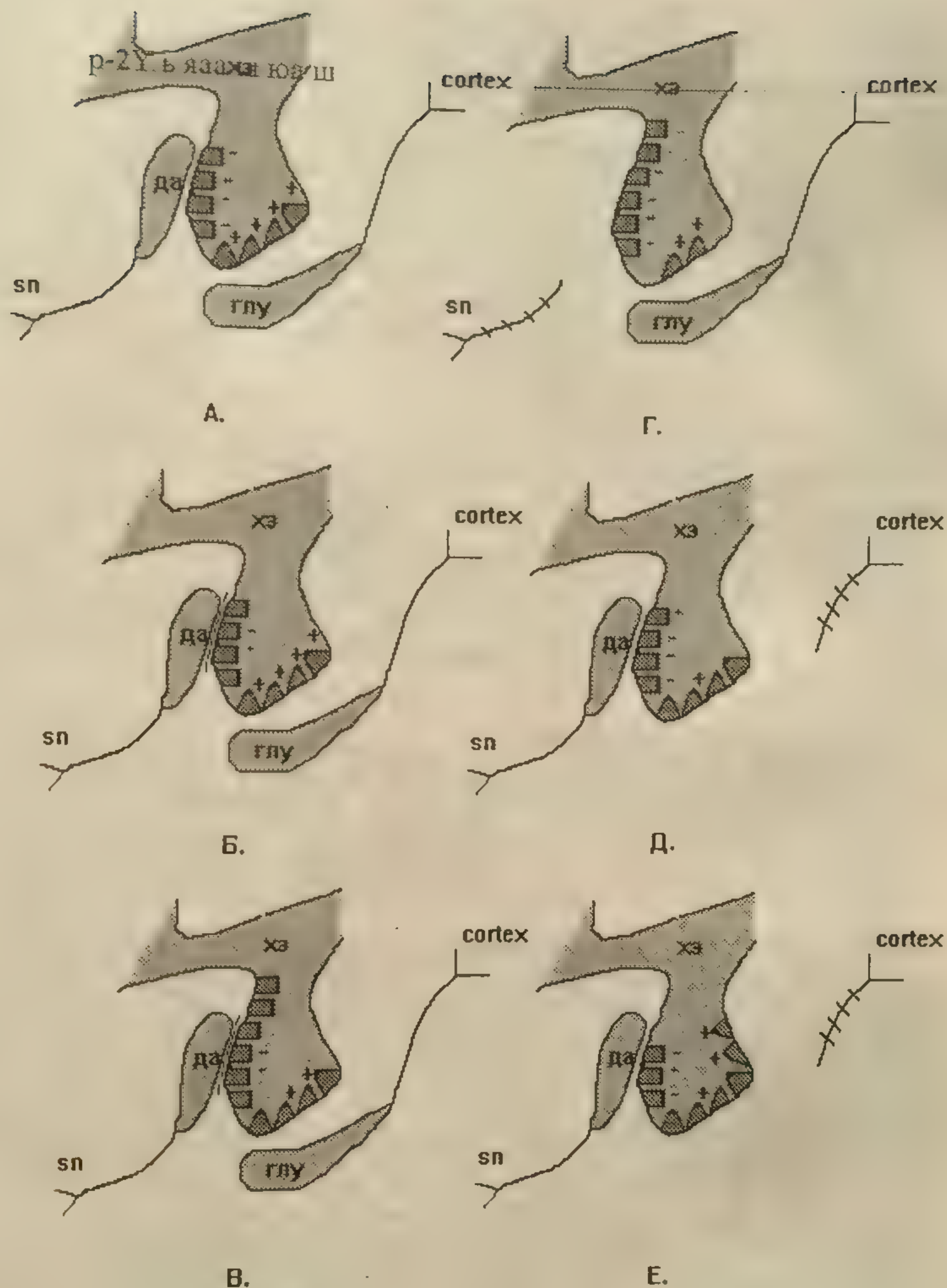


Рис. 4.2 Схема, иллюстрирующая гипотезу о взаимодействии глутамат- и дофаминергических волокон на нейронах стриатума. А. В нормальных условиях дендриты стрио-нигральных проекций получают дофаминергические проекции из черной субстанции, а глутаматергические входы из коры большого мозга соответственно. Дофаминергические афференты локализуются преимущественно на шейке дендритного шипика, в то время как глутаматергические на его головке.

[Schwarcz et al., 1978]. В работах [Hattori, Fibiger, 1982; Pature et al., 1987] приводятся данные о подавлении двигательной активности животных при локальной аппликации в стриатум ДЭЭГ и квисквалата - введение этих веществ на фоне хронического введения галоперидола устраняет седативное действие, что свидетельствует о вызванном галоперидолом снижении чувствительности рецепторов ВАК. Имеются также постмортальные наблюдения о снижении числа АМРА рецепторов у больных шизофренией при длительном применении нейролептиков [Kerwin et al., 1988].

Из этой гипотезы следует, что возможна коррекция психозов с помощью ВАКергических средств. При этом однократное назначение антагонистов рецепторов ВАК, особенно на фоне нейролептика, приведет к усилению психоза, однократное назначение агониста ВАК снизит психотическую реакцию, а длительное назначение антагониста рецепторов ВАК приведет к повышению их чувствительности и развитию антипсихотических эффектов.

Однако на основании представленных данных пока сложно делать далеко идущие выводы. Подобные взаимоотношения дофаминергической и ВАКергической систем характерны для структур с высокой плотностью как дофаминовых рецепторов, так и рецепторов ВАК (стриатум, прилежащее ядро), в то время как во многих нейрональных образованиях (гиппокамп, новая кора) подобного соответствия не установлено. Поэтому последствия системного использования ВАКергических средств до конца не ясны и требуют дальнейших исследований.

4.2. ГАМКергическая система.

При исследовании влияния антагонистов NMDA рецепторов на базальный уровень внеклеточной концентрации ГАМК в стриатуме и его изменение под влиянием высокой концентрации ионов калия было установлено, что фенциклидин и МК-801 ингибируют K^+ -индуцированный выброс ГАМК, но не влияют на ее базальный уровень. Этот эффект антагонистов снимается самой NMDA [Hondo et al., 1995].

На изолированных нейронах гиппокампа было показано, что NMDA подавляет токи, вызванные активацией ГАМК_A рецепторов, причем это действие NMDA связано с Ca^{2+} -зависимыми процессами фосфорилирования [Chen, Wong, 1995].

Введение бикукуллина, антагониста ГАМК_A рецепторов, в дорсомедиальные ядра гипоталамуса крыс вызывает тахикардию, ассоциированную с защитной реакцией. Считается, что этот эффект связан с активацией ГАМКергических интернейронов в ядра солитарного тракта. Блокирование действия бикукулина как антагонистом NMDA

Б. При однократном назначении нейролептиков подавляется активность ДА рецепторов, что при сохранении активности глутаматергического входа приводит к возбуждению клетки. **В.** При длительном назначении нейролептиков наблюдается увеличение количества ДА рецепторов при компенсаторном снижении ВАКрецепторов, что возвращает к равновесию. **Г.** Разрушение черного вещества приводит к аналогичным с "Д" изменениям, однако более выраженным и необратимым. **Д.** Перерезка глутаматергического входа приводит к кратковременной депрессии мембранного потенциала. **Е.** В дальнейшем происходит нормализация клеточного потенциала.

Условные обозначения: квадрат - дофаминовый рецептор, треугольник - глутаматный рецептор; "+" - возбуждение, "-" - торможение; влияние антагониста рецепторов дофамина обозначено прерывистой линией (Freed, 1986).

рецепторов МК-801, так и антагонистом неNMDA рецепторов CNQX указывает, что выброс ГАМК вызван действием глутамата на ионотропные рецепторы ВАР, расположенные на ГАМКергических интернейронах [Kunos, Varga, 1995].

При изучении участия метаботропного рецептора mGluR2 в синаптической передаче между митральными и гранулярными клетками зрительного бугра было показано, что его активация в гранулярных клетках приводит к уменьшению ГАМК-стимулированных ингибиторных постсинаптических токов в митральных клетках, то есть ослабляет ГАМКергическую передачу импульса между этими двумя типами клеток. Авторы считают, что это взаимовлияние двух медиаторных систем является важным фактором в поддержании отношения сигнал-шум, что и позволяет выделять и разделять различные обонятельные стимулы [Hayashi et al., 1993].

4.3. Опиатергическая система.

В ряде исследований было показано, что активация μ -опиатных рецепторов приводит к ослаблению эффектов ВАР. Так, μ -опиатный агонист DAMGO уменьшал возбуждение спинальных нейронов I-IV слоев задних рогов. При этом в большей степени ингибировалось действие NMDA, нежели AMPA [Lei, Wilcox 1990]. Морфин оказывал антагонистическое действие на нейрональное возбуждение нейронов V слоя заднего рога спинного мозга, вызванное локальной аппликацией глутамата [Zieglgansberger, Satoh, 1975; Dostrovsky, Pomeranz, 1976; Belcher, Ryall, 1978]. Эффект морфина был налоксон-чувствительным, что свидетельствует об участии опиатных рецепторов. При сочетанном интратекальном введении антагонисты ВАР оказывают потенцирующее действие на морфиновую анальгезию [Chapman, Dickenson, 1992a]. Возможно, что опиаты и ВАР взаимодействуют через системы вторичных мессенджеров, которыми могут быть ионы кальция, фосфоинозитиды или циклические нуклеотиды [Levy et al., 1981]. Однако трансмембранный потенциал, вызванный NMDA, не блокируется морфином [Riveros, Orrego, 1986].

Спинальное гипоальгетическое действие антагонистов ВАР также ослабляется при одновременном их введении с опиатными антагонистами [Nasstrom et al., 1993]. Существует корреляция между морфин-индуцированной активацией нисходящих ингибиторных влияний и его способностью при внутрижелудочковом введении ослаблять ноцицептивное действие агонистов ВАР, введенных интратекально [DeLander, Wahl, 1989, 1991; Jensen, Yaksh, 1989]. Поэтому можно предположить, что ВАРергическая система модулирует спинальное действие морфина за счет взаимодействия с нисходящими ингибиторными влияниями.

Взаимодействие ВАРергической и опиатергической систем изучено и на супраспинальном уровне при исследовании роли ВАРергической системы в эндогенных механизмах болевой регуляции. На основании экспериментальных данных была предложена схема взаимодействия этих двух систем в центральном околосинаптическом веществе (ЦОВ). Согласно этой схеме, стимуляция опиатных рецепторов в этой области усиливает возбуждающие влияния на большое ядро шва (БЯШ) через тормозные ГАМКергические нейроны и, следовательно, приводит к повышению болевых порогов. Стимуляция NMDA рецепторов оказывает аналогичное действие. Поэтому предполагается, что эффекты стимуляции опиатных и NMDA рецепторов конвергируют на общие ВАРергические нейроны, проецирующиеся в БЯШ [Jacquet, 1988].

Еще одним примером взаимодействия ВАРгерической и опиатергерической систем может служить экспериментально установленный факт блокады развития морфиновой толерантности антагонистами рецепторов NMDA [Беспалов и др., 1994; Marek et al., 1991a, 1991b; Trujillo, Akil, 1991], ингибирование развития сенситизации к кокаину и амфетамину [Karler et al., 1989; Schenk et al., 1993]. Блокировать развитие толерантности к морфину может также и антагонист глицин-связывающего сайта NMDA рецепторов ACEA-1328 (1,4-дигидро-6,7-диметил-5-нитрохиноксалин-2,3-дион) [Lutfy et al., 1995]. Развитие зависимости к морфину ингибируют также антагонисты метаботропных рецепторов ВАР [Fundytus, Codere, 1994]. О связи опиатной и ВАРгерической систем см. также [Xie, Lewis, 1995]. Влияние лигандов рецепторов ВАР на развитие толерантности и зависимости к различным веществам мы рассмотрим также в главе 7.

Здесь же мы остановимся только на взаимодействии ВАРгерической системы и этанола, проблемы, которой посвящено немало работ. В культуре клеток этанол селективно ингибирует действие NMDA рецепторов, причем эффект обращается высокими дозами глицина. Это действие этанола связано с тем, что он уменьшает частоту открывания ионного канала [Weight et al., 1993]. После хронического приема алкоголя у животных во многих областях мозга возрастает количество NMDA рецепторов. (В отличие от этанола, барбитураты сильнее ингибируют каинатные рецепторы) [Hoffman, Tabakoff, 1993]. В нескольких системах *in vitro* было показано, что этанол проявляет свойства антагониста NMDA рецепторов [Balster et al., 1992]. При этом, как и большинство антагонистов рецепторов ВАР, он снижает нейротоксическое действие различных ВАР [Lustig et al., 1992]. В то же время судороги, возникающие при отмене этанола, блокируются такими NMDA антагонистами, как CPP и MK-801 [Riaz, Faingold, 1994]. Недавно были опубликованы данные, указывающие на то, что ингибирование этанолом NMDA рецепторов включает в себя глицин-чувствительный и глицин-нечувствительный компоненты, что позволяет предполагать два различных молекулярных механизма данного процесса [Buller et al., 1995].

Изучение действия этанола и других спиртов на NMDA рецепторы позволило даже сделать определенные выводы о третичной структуре NMDA-рецепторного белка. Хорошо известно, что при увеличении числа атомов углерода (n) в алифатических нормальных спиртах от 1 до 5 экспоненциально возрастает их токсичность, растворимость в липидах и способность нарушать структуру липидных мембран. Однако если токсичность достигает максимума при длине цепочки от 6 до 8 атомов, а затем резко падает ("эффект прерывания", "cut off effect"), два других параметра продолжают увеличиваться симбатно с увеличением длины углеродной цепи. Для объяснения этого эффекта было исследовано влияние алифатических спиртов с различной длиной углеродной цепи на NMDA рецепторы, так как ранее было показано, что ингибирование этих рецепторов играет важную роль в развитии алкогольной интоксикации. Оказалось, что способность к ингибированию экспоненциально возрастает в серии спиртов от метилового до пентилового ($n=1-5$), достигает максимума при $n=6-8$, а затем резко падает. В случае неNMDA рецепторов ингибирующую активность, пропорциональную их гидрофобности, проявляют все первичные спирты до гептилового, а октиловый и нониловый спирты не активны [Akinsola et al., 1995]. Этот "эффект прерывания" ингибирования спиртами NMDA рецепторов объясняется, по мнению авторов, существованием в рецепторном белке гидрофобного кармана, в котором могут помещаться молекулы только определенного размера [Peoples, Weight, 1995]. Так как наличие подобных гидрофобных областей в рецепторных белках, способных связывать первичные спирты, установлено и для некоторых других типов

ионотропных рецепторов нейромедиаторов, исследования с использованием химерных молекул, содержащих N-концевой участок никотинового холинорецептора и C-концевой фрагмент 5-HT рецептора, позволили локализовать участок связывания этанола на N-концевом участке [Weight et al., 1996].

Таким образом, накопленный экспериментальный материал позволяет говорить об огромной роли ВАРгических структур в регуляции важнейших физиологических и патофизиологических процессов мозга. Несомненно, что в предстоящие годы будет сделано немало в плане более глубокого понимания механизмов регуляции важнейших психических функций, протекающих при участии ВАРгической медиаторной системы.

ГЛАВА 5. УЧАСТИЕ ВОЗБУЖДАЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ В РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

От передачи нервного импульса до нейротоксического эффекта при перевозбуждении рецепторов с последующей защитной реакцией вплоть до гибели клетки - таков диапазон физиологических и патологических эффектов ВАК в рамках нормальной деятельности организма. Рассмотрим теперь подробнее участие ВАКергической системы в регуляции основных процессов жизнедеятельности.

5.1. Сердечно-сосудистая система

Уже в первых обзорных статьях по изучению роли ВАК сообщается о возбуждающем действии дикарбоновых аминокислот на системную гемодинамику [Curtis et al., 1960; Fagg, 1985]. Позднее было показано, что глутамат и аспартат при внутривенном и внутрицентральной введении значительно повышают системное артериальное давление, увеличивают сердечный выброс, минутный объем кровообращения и общее периферическое сопротивление, повышают ЧСС, оказывая отчетливое кардиотоническое действие [Ковалев и др., 1985; Петров, 1995]. Причем усиление деятельности сердца происходит как за счет периферического (прямой кардиотропный), так и центрального (симпатикотропный) компонентов [Писаренко и др., 1985].

Установлено, что при хроническом 30-ти дневном пероральном введении в дозах 50-200 мг/кг глутаминовая и аспарагиновая кислоты оказывают положительное инотропное влияние на миокард крыс на модели "изадриновой" сердечной недостаточности, не уступая по эффективности рибоксину [Петров, 1995].

В качестве возможного механизма прямого кардиотропного действия аминокислот предполагают их влияние на окислительные процессы и накопление макроэргических соединений в сердечной мышце [Писаренко и др., 1985], снижение потребности миокарда в кислороде и выраженное антиоксидантное действие [Удинцев, Иванов, 1984]. Однако, несмотря на возможность прямого вазо- и кардиотропного действия глутамата, в основе его кардиогемодинамических эффектов лежит нейротропный симпатоактивирующий эффект.

Обнаружена четкая закономерность в динамике содержания медиаторных аминокислот в пулах вазоконстрикторных нейронов продолговатого, спинного мозга и симпатических ганглиях у нормотензивных животных и у животных с развивающейся артериальной гипертензией и гипотонией. Наблюдается дисбаланс тормозных и возбуждающих медиаторных аминокислот при развитии артериальной гипертензии (увеличение уровня возбуждающих аминокислот), а при развитии экспериментальной артериальной гипотонии регистрируется относительное уменьшение содержания глутамата в вазомоторных структурах мозга [Петров, Гурбанов, 1985]. Накопленные в настоящее время данные свидетельствуют, что синаптическая активация рецепторов ВАК в ядрах солитарного тракта и в спинном мозге играет ключевую роль в регуляции кардиоваскулярной системы [Gordon, 1995].

В основе кардиогемодинамических эффектов глутаминовой кислоты при внутривенном введении в дозах 20-500 мг/кг лежит увеличение фоновой активности и сомато-симпатических рефлекторных ответов в постганглионарных нейронах нижнего сердечного и почечного нервов. При анализе структуры рефлекторного ответа установлено выраженное усиление под влиянием глутаминовой кислоты раннего и позднего компонентов сомато-симпатического рефлекторного ответа.

что позволило предположить действие аминокислоты на формирование тонических и фазических рефлекторных реакций на уровне бульбарных и сегментарных симпатических структур. Согласно современным представлениям они, в аспекте регуляции сосудистого тонуса, рассматриваются как единый регуляторный комплекс с приоритетным положением бульбарных структур сосудодвигательного центра [Karoog et al., 1990; Gordon F.J., 1995].

В работах В.И.Петрова [1985;1995] показано участие глутамата в передаче нисходящих ретикуло-спинальных влияний. Так, внутривенное введение глутаминовой кислоты в дозах 50-500 мг/кг усиливало сомато-висцеральные ответы в отведении с белой соединительной веточки третьего грудного сегмента при стимуляции нисходящих путей дорсолатерального канатика спинного мозга. Кроме того, наблюдалось облегчение прессорных сосудистых реакции при прямом микроэлектродном раздражении вазомоторных структур продолговатого и спинного мозга, блокирующихся диэтиловым эфиром глутамата, что позволило предположить определяющую роль глутаминовой кислоты как медиатора возбуждения бульбарных нейронов, реализующих барорецепторные сосудистые рефлексы.

Позднее данное предположение было подтверждено и показано, что NMDA рецепторы интермедиолатерального столба спинного мозга играют определяющую роль в опосредовании симпатизирующих кардиоваскулярных влияний, вызываемых при стимуляции вентролатеральной прессорной зоны продолговатого мозга, а также участие рецепторов ВАР в регуляции на бульбарном уровне собственных сосудодвигательных рефлексов [Holt et al., 1991].

Установленная в работе Роговой [1994] однонаправленность влияния микроинъекций глутамата в роstralную зону на реализацию кардиоваскулярных рефлексов, получаемых при электрической стимуляции продолговатого мозга, гипоталамуса, соматических и висцеральных афферентов, объясняется, по-видимому, тем, что конечным звеном всех этих рефлексов на бульбарном уровне являются выходные симпатизирующие нейроны. Результирующие влияния по нисходящим проекциям этих нейронов передаются к интермедиолатеральным ядрам спинного мозга. Часть нейронов латеральной зоны гипоталамуса имеет прямые (моносинаптические) проекции к интермедиолатеральным ядрам спинного мозга, о чем свидетельствует коротколатентная волна гипоталамо-симпатического вызванного разряда. Длиннолатентная волна является результатом их полисинаптической активации, причем вставочный нейрон этой дуги имеет глутаматергическую природу и располагается в группе выходных симпатизирующих нейронов бульбарного вазомоторного центра. Именно эти клетки являются точкой приложения ВАРгических средств - потенциальных модуляторов тонуса сердечно-сосудистой системы.

Однако, еще в работах McAllen [1990] и Dampney [1991], посвященных изучению кардиоваскулярных эффектов глутамата при микроинъекциях последнего в различные бульбарные структуры, было показано его разнонаправленное действие в зависимости от места введения. Впоследствии с открытием различных типов ВАРгических рецепторов стала понятна основа подобных гемодинамических феноменов.

Структуры продолговатого мозга, участвующие в вазомоторной регуляции, по-разному чувствительны к возбуждающим аминокислотам. Особый интерес вызывают кардиоваскулярные нейроны вентральной поверхности продолговатого мозга, осуществляющие текущий и рефлекторный контроль деятельности сердца и сосудов [Лебедев, 1986]. Микроинъекции глутамата в депрессорные зоны продолговатого мозга вызывают понижение артериального давления, в то время

как введение глутамата в прессорные зоны приводит к сильному подъему САД [Gean et al., 1993].

Подробный анализ участия в регуляции системной гемодинамики различных зон бульбарного вазомоторного центра, предпринятый в работах [Sun et al., 1988; Blessing, 1993], показал связь системного эффекта глутаминовой кислоты с активацией того или иного типа рецепторов ВАК. Так, усиление симпатикотонических реакций при введении глутамата в ростральную зону продолговатого мозга связано с активацией рецепторов AMPA типа, тогда как депрессорное действие аминокислоты при микроинъекции в каудальную зону вызывалось преимущественным возбуждением NMDA рецепторов.

Сведения, накопленные в литературе об участии рецепторов ВАК структур гипоталамуса и более высоколежащих нейрональных образований в регуляции сердечной деятельности и сосудистого тонуса, немногочисленны и весьма противоречивы, что, очевидно, связано с опосредованностью этих влияний на показатели кардиогемодинамики. Вместе с этим пропорционально возрастает роль этих структур в регуляции психических функций центральной нервной системы.

5.2. Моторная активность

Локальная аппликация глутаминовой, аспарагиновой и гомоцистеиновой кислот к моторным спинальным ядрам низших позвоночных приводит к появлению так называемой "фиктивной ходьбы", проявляющейся в перемежающейся ритмической активности конечностей животного, подобной ходьбе по суше или плаванию [Roop, 1990]. У высших млекопитающих роль афферентного звена для запуска и контроля ритмических движений выполняют, по-видимому, ядра мезенцефальной зоны мозга. В работе [Glaurn et al., 1992] на децеребрированных котах было показано активирующее влияние введения в лимбическую область NMDA и дигидрокаиновой кислоты на запуск моторного акта. Аналогичный эффект наблюдался при электрической стимуляции мезенцефального локомоторного региона.

Фармакологический анализ, выполненный Grillner and Wallen (1987) с использованием агонистов (каинат, квисквалат, NMDA), антагонистов (кинуренат, ДЭЭГ, D-AP5), а также ингибиторов обратного захвата (дигидрокаинат, р-хлоромеркурофенилсульфонат) ВАК, позволил установить участие в развитии "фиктивной ходьбы" разных типов рецепторов. Позднее, в работе [Nelson et al., 1986] на нативных препаратах миноги, эмбрионах *Xenopus* и культурах нейронов было установлено, что активация каинатных рецепторов приводит к появлению коротких высокочастотных (5 - 8 Гц) пачек разрядов моторных нейронов, в то время как ответы NMDA рецепторов характеризуются низкочастотной (0,05 - 4 Гц), но с более стабильной и длительной активностью [Dale, 1986].

Grillner [1987] в своих работах удалось установить наличие прямой связи между осцилляциями мембранного потенциала моторных нейронов (10 - 25 мВ) и активностью плавательной мускулатуры миноги. По предположению автора первичная стимуляция нейронов приводит к краткосрочной активации AMPA рецепторов с последующей кратковременной деполяризацией клетки и активацией NMDA- (снятие магниевого блока) и потенциалзависимых кальциевых каналов. Происходящая вследствие этого выраженная деполяризация нейрона носит долговременный характер, сопровождается активацией кальцийзависимых калиевых каналов и заканчивается повторной магниевой блокадой NMDA канала. Снижение уровня входящего кальция приводит, в свою очередь, к снижению активности калиевых каналов и постепенной спонтанной деполяризации нейрона. Цикл повторяется.

5.3. Психические функции

Изучению структурно-функциональных зависимостей и фармакологического действия лигандов глутаматергических рецепторов на процессы высшей нервной деятельности посвящено большое количество работ. Однако до сих пор не предложено какой-либо стройной концепции системных механизмов, лежащих в основе этих эффектов. Работы по данной проблеме можно разделить на две большие группы. С одной стороны, это исследования, носящие чисто феноменологический характер и имеющие своей целью изучение системных эффектов ВАК на поведение животных. С другой стороны, это узкоспециальные работы в области нейрофизиологии, биохимии и молекулярной фармакологии по определению механизма действия известных лигандов рецепторов ВАК. По всей вероятности, подобный этап в развитии знаний о ВАКергической регуляции физиологических функций является вполне естественным - идет активный процесс накопления фактического материала, итогом которого будет более глубокое понимание роли и закономерностей функционирования системы возбуждающих аминокислот и создание нового класса лекарственных препаратов, обладающих ВАКергической активностью.

Поэтому при рассмотрении вопроса об участии различных типов рецепторов ВАК в регуляции поведенческой активности животных мы будем использовать накопленные к настоящему времени материалы по оценке фармакологических свойств лигандов рецепторов ВАК.

Внутрижелудочковое или системное введение ВАК приводит к выраженному дозозависимому повышению двигательной активности животных, вплоть до развития "дикого бега" (wild running), заканчивающегося генерализованным судорожным припадком. Это возбуждающее действие можно в значительной степени снизить путем предварительного введения антагонистов NMDA или AMPA рецепторов [Lalonde, Cote, 1993a].

Обратный эффект оказывают антагонисты рецепторов ВАК. В экспериментах на грызунах было показано, что системное введение в субтоксических дозах фенциклидина, неконкурентного антагониста NMDA рецепторов, вызывает развитие стереотипии, проявляющейся в увеличении незавершенных двигательных элементов поведения, циклично повторяющихся движений, сопровождающихся зачастую атаксией [Koeck, Colpaert, 1990]. В ряде случаев фенциклидин вызывал каталепсию, отличающуюся по характеру и выраженности от каталепсии, вызванной введением нейролептиков [Koeck et al., 1988]. Аналогичные эффекты вызывают и конкурентные антагонисты NMDA и AMPA рецепторов [Danysz et al., 1994; Meldrum, 1994].

Приведенные факты свидетельствуют о существенной роли ВАКергической нейромедиации в регуляции поведения. Как известно, важное значение в регуляции двигательной активности играет стрио-паллидарная система мозга. Долгое время основными медиаторными системами в ней считались дофамин-, холин-, и ГАМКергические. И лишь в последнее время было показано наличие в данной структуре большого числа глутаматергических терминалей, играющих важную, если не ключевую, роль в процессах регуляции локомоторного акта.

Широкое представительство глутаматергических рецепторов в гиппокампе и новой коре - структурах напрямую связанных с формированием, хранением и извлечением следа памяти и механизмами обучения - позволило исследователям предположить возможность влияния глутаматергических соединений на процессы обучения и память.

В современной литературе накоплено значительное количество данных о психотропных эффектах, вызываемых блокадой ВАР рецепторных структур. В настоящее время хорошо известно, что антагонисты NMDA и, в меньшей степени AMPA рецепторов, приводят к нарушению фиксации следа памяти. В наиболее выраженной форме антиамнестические эффекты веществ проявляются на моделях пространственного обучения [Heale, Harley, 1990; Advokat, Pellegrin, 1992; Buffalo E.A. et al., 1994; Slechta D.A., 1994].

Так, на моделях водного лабиринта Морриса и радиального лабиринта Олтона было показано, что дизоцилпин, кетамин, D-AP5 и CPP при системном и внутрицентральной введении предотвращают фиксацию следа памяти в условиях изменяющейся обстановки, не нарушая в значительной степени состояния рабочей памяти и сформированного навыка пространственного обучения [Kleinschmidt et al., 1987]. Аналогичные данные были получены для соединений с неNMDA антагонистической активностью. Установлено, что неселективный антагонист AMPA рецепторного комплекса - ДЭЭГ (360 мг/кг), не влияя на количество ошибок в водном лабиринте Морриса [Lalonde, Joyal, 1991], нарушал в значительной степени воспроизведение концептуального навыка визуально-дискриминантного и оперантного обучения [Freed, Wyatt, 1981].

Следует обратить внимание на различия в характере амнестического действия соединений, выявленные в эксперименте. Так, при изучении формирования навыка пространственного обучения у крыс в водном лабиринте было показано, что ДЭЭГ и CNQX не влияют на время поиска видимой платформы и платформы, спрятанной под водой (модифицированная версия лабиринта, позволяющая определить состояние концептуальной памяти и видеомоторную координацию). Лишь значительное усложнение поставленной задачи (закономерное перемещение по дням невидимой платформы) приводит к появлению достоверных отличий по сравнению с животными контрольной группы. На модели Т-образного лабиринта ДЭЭГ (120-360 мг/кг) не влиял, а кетамин лишь в высоких дозах (15 мг/кг) увеличивал количество ошибок правильного выбора рукава лабиринта. Возможно, при постановке задачи на простых моделях обучения не требуется значительная активация ВАРгических структур, что объясняет отсутствие эффекта их антагонистов в данных исследованиях. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о значительно меньшем влиянии неNMDA антагонистов на процессы консолидации памятного следа и сложные процессы концептуального анализа воспринимаемой информации.

Известно, что переработка зафиксированного следа памяти в процессе пространственной дифференцировки осуществляется в структурах новой коры и гиппокампе, от которых поток переработанной информации о произведенном на основании индивидуального опыта решении преключается через п.ассумбенса и другие структуры на двигательные системы мозга [Mogenson, 1987]. Возможно, что глутаматергическая система принимает участие в различных звеньях процесса пространственной дифференцировки. NMDA рецепторные структуры участвуют, по-видимому, в извлечении имеющейся информации и фиксации новой в ходе переучивания навыка; в то время как рецепторы неNMDA типа определяют в большей степени реализацию принятого решения через волокна гиппокампа п.ассумбенса и другие структуры. Подтверждением этого предположения являются данные Davis и соавт. [1992], установивших параллели между состоянием пространственной памяти у животных и выраженностью навыков оперантного обучения в зависимости от дозы антагонистов AMPA рецепторного комплекса.

В ряде работ, посвященных изучению этого вопроса было показано, что как низко-, так и высокочастотная стимуляция афферентных волокон приводит к

выраженной активации эффекторных нейронов соответствующих зон гиппокампальной формации и других структур, ответственных за обработку и фиксацию новой информации. В работе [Dougherty, Willis, 1992] высказывается предположение о преимущественной активации неNMDA рецепторов при низкочастотной стимуляции, соответствующей "нормальным" условиям деятельности мозга, в то время как высокочастотная стимуляция приводит к активации NMDA рецепторного комплекса и связана с переходом нейрона к иному уровню функциональной активности, необходимому для фиксации энграмм [Bristow et al., 1986].

Впоследствии было показано, что высокочастотная спайковая активность афферентных волокон гиппокампа наблюдается в естественных условиях, требующих пластической перестройки нейрона (фиксация новой информации, эмоциональная реакция и т.д.). В экспериментах с использованием селективных антагонистов различных подтипов глутаматных рецепторов установлено преимущественное участие в этом процессе NMDA рецепторного комплекса [Collingridge, Davies, 1989a]. Характер ответов нейронов на высокочастотную стимуляцию носил двоякий характер: часть клеток (фазического типа) на длительное время (минуты, часы) переходила в состояние эпилептиформной активности, более характерное для работы в условиях отсутствия факторов, подавляющих активность NMDA рецептора (ионы Mg^{2+} , ингибирующие влияния ГАМК) [Daw, 1993]. У другой части нейронов (тонического типа) после нескольких спайковых разрядов возникала стойкая деполяризации мембраны, сохраняющаяся на протяжении нескольких часов и даже суток [Johnston et al., 1992]. Данный тип реакции клеток гиппокампа получил название долговременной потенциации и лег в основу объяснения процессов нейрональной пластичности и фиксации памятного следа.

5.4. Долговременная потенциация

Долговременная потенциация синаптической передачи, или long-term potentiation (LTP), является уникальной формой синаптической пластичности, присутствующей в большинстве возбуждающих синапсов ЦНС. Преимущественное наличие LTP в структурах, связанных с формированием памяти и обучением (гиппокамп, новая кора, миндалина и другие), привело к предположению о связи LTP с мнестическими процессами. Впервые LTP была описана в гиппокампе [Lomo, 1966], затем аналогичный процесс был зафиксирован в многочисленных структурах центральной и периферической нервной системы различной иерархической сложности. В наибольшей степени исследованы закономерности формирования LTP в работах на синаптических контактах коллатералей Шаффера и пирамидных нейронов зоны CA1 гиппокампа [Madison et al., 1991]. Как правило, LTP - это NMDA-зависимый процесс, развивающийся в моносинаптических контактах [Collingridge et al., 1985]. Однако, первоначальная точка зрения об исключительной роли NMDA рецепторов в этом процессе в дальнейших исследованиях была пересмотрена. В настоящее время показано, что NMDA рецепторы определяют лишь индукцию и частично поддержание LTP [Nicoll, 1975]. Открыты также структуры и синапсы, в которых индукция LTP не связана с активацией NMDA рецепторов.

Общепринятого определения LTP не существует. Однако описательно можно сказать, что данный феномен является электрофизиологическим показателем состояния нейрона в период посттетанической стимуляции, характеризующийся длительным изменением его вольт-амперных характеристик и сопровождающийся

пластической перестройкой клетки. Постулируется, что в отличие от простой посттетанической потенциации продолжительностью не более 15 минут длительность LTP измеряется часами и сутками [Griffith, 1990].

Принято выделять незатухающую LTP (длительность несколько часов и сутки) и затухающую, или кратковременную (short-term potentiation - STP; длительность 30-60 минут) [Hopkins, Johnston, 1988]. По механизму развития выделяют NMDA-зависимую и NMDA-независимую формы LTP.

Весьма существенным для развития представлений о механизмах развития NMDA-независимой формы LTP стало открытие ее доминирующей роли в процессах ориентации и фиксации индивидуального опыта у некоторых певчих птиц и домашних голубей (*Columbia livia*). Необходимость пространственной ориентации при длительных перелетах привела к увеличению у этих животных размеров гиппокампа и его роли в ходе онтогенеза [Bingman et al., 1989]. На препаратах мозга птиц впервые было показано, что высокочастотная стимуляция пирамидных нейронов зоны CA1 гиппокампа приводила к появлению вызванного постсинаптического потенциала длительностью более 2 часов, не зависящего от наличия в инкубационной среде AP5 или МК-801, что свидетельствовало об отсутствии связи LTP с NMDA рецепторным комплексом в этой зоне.

Развитие LTP возможно даже в простейших нейрональных образованиях. Аналогичный по механизму процесс обнаружен в нервно-мышечном синапсе мышцы, открывающей клешню у речного рака, что позволило использовать его в качестве удобного объекта для исследований [Takeuchi, 1972]. 15-20 минутная стимуляция афферентного волокна нервно-мышечного синапса с частотой 5 Гц приводит к длительному (до 1 часа) облегчению (примерно в 5 раз) синаптической передачи. Однако более короткое, но частое (50 Гц) раздражение вызывает LTP [Sherman, Atwood, 1971]. Установлено, что в данном случае LTP вызвана длительным увеличением выброса глутамата, что, возможно, связано с активацией пресинаптических неNMDA рецепторных терминалей [Baxter et al., 1985]. В большей степени изучен и наиболее близок по форме к гиппокамальному ответ ВАКергических нейронов педально-плеврального ганглия аплизии, не зависящий, кстати, от активации NMDA рецепторов [Sherry et al., 1989].

Однако наиболее интенсивно изучается формирование ВАК-зависимой LTP в ЦНС млекопитающих вообще и в гиппокампе, в частности. Рассмотрим более подробно особенности развития LTP для каждого из рассмотренных выше ВАКергических афферентных входов гиппокампа.

Мишистые волокна. Эта группа волокон является классической моделью изучения NMDA независимой формы LTP. Впервые ее существование было описано Alger и Teyler [1976]. Данные морфологии свидетельствуют, что каждый пирамидный нейрон CA3 получает до 50 синаптических входов от гранулярных клеток зубчатой фасции в сочетании с 12000 синапсов от других нейронов CA3 [Amaral, Ishizuka, 1990], что позволяет говорить о ассоциативной роли этой зоны в процессах переработки информации и ее фиксации. LTP на нейронах CA3 блокируется практически исключительно CNQX, что свидетельствует о преимущественном вовлечении в ее развитие AMPA/каинатных рецепторов stratum lucidum CA3 (в отличие от stratum radiatum, где оканчиваются комиссуральные волокна кортикогиппокамального синаптического входа в CA3 с наибольшим представительством рецепторов NMDA типа [Harris, Cotman, 1986].

LTP, вызываемая высокочастотной стимуляцией мшистых волокон, в 20 % случаев носит угасающий (длительность до часа), а в 80 % неугасающий (длительность несколько часов) характер [Errington et al., 1987]. Пока не ясен механизм развития LTP в этих синапсах. Не установлено изменений в потенциалах покоя и динамике ВПСП. Вместе с этим показано увеличение мембранной проводимости и амплитуды ВПСП при высокочастотной стимуляции [Kauer, Nicoll, 1988]. С наибольшей вероятностью можно говорить о возрастании выброса глутамата, чувствительности и числа рецепторов ВАК. Предполагается также, что роль потенциал-чувствительных кальциевых каналов в этих синапсах играет NMDA чувствительный рецепторно-канальный комплекс, напрямую связанный с развитием долговременной потенциации [Kano, Kato, 1988]. В подтверждение этого приводятся данные о том, что снижение уровня внеклеточного Ca^{2+} . Запирание ионных токов методом patch-clamp на уровне -80 мВ предотвращает развитие LTP, в то время как инъекция цАМФ в синаптическую щель способствует усилению активности потенциалчувствительных кальциевых каналов и увеличивает вероятность развития LTP [Jaffe, Johnston, 1990].

Проводя сравнительную оценку NMDA-зависимой и NMDA-независимой форм LTP, следует отметить наличие большого числа общих черт в механизмах их развития. Главным звеном каскадного процесса индукции является увеличение внутриклеточного кальция с последующей активацией протеинкиназ (опыты с цАМФ подтверждают участие цАМФ-зависимых протеинкиназ как минимум на момент индукции) [Muller et al., 1988] и структурной перестройкой субъединиц рецепторного комплекса, образующих ионный канал. Обязательным участником обеих форм LTP является также ассоциированный с метаботропным рецептором пертуссин-чувствительный G-белок [Lynch, Baudry, 1992].

Среди главных отличительных черт следует отметить, что в отличие от NMDA-зависимой LTP, для индукции которой достаточно одиночного пресинаптического стимула на фоне выраженной деполяризации, в NMDA-независимой форме потенциации необходимо сочетание деполяризации с высокочастотной пресинаптической стимуляцией [Douglas, 1977]. Кроме того, среди главных отличительных свойств неNMDA LTP следует отметить возможность существования полисинаптических цепей [Zalutsky, Nicoll, 1990], гетеросинаптических контактов и важную роль пресинаптического звена.

Перфорантный путь (ПП) и коллатерали Шаффера оказывают влияние на развитие как NMDA, так и NMDA-независимых типов LTP. Однако, волокна каждого типа имеют вполне определенное пространственное расположение. Морфологически и функционально выделяют медиальный и латеральный отделы ПП, которые образуют неперекрывающиеся зоны в молекулярном слое зубчатой фации [Steward, 1976]. Медиальный иннервирует медиальную треть гранулярных клеток, а латеральный оставшиеся две трети. Установлено, что медиальный пучок иннервирует зону с преимущественным содержанием NMDA рецепторов и, соответственно, NMDA-зависимой формой LTP, в то время как латеральный имеет обратное соотношение и форму LTP [Dolphin, 1993].

Коллатерали Шаффера. Нейрофизиология синаптической передачи в коллатерали Шаффера, включая механизмы индукции LTP, изучена наиболее подробно. Важная роль этой зоны в процессах фиксации энграмм, позволяет рассматривать ее в качестве базовой лабораторной модели по изучению

механизмов памяти и процессов нейрональной пластичности. Аксональные входы коллатералей Шаффера способны вызывать на нейронах зоны CA1 обе формы длительной потенциации с некоторым преобладанием NMDA-зависимого типа LTP. В отличие от других зон гиппокампальной формации, для индукции LTP в данной зоне требуется значительно более жесткая стимуляция (200 Гц против 100), приводящая однако и к более длительной деполяризации пирамидных нейронов зоны CA1 [Errington et al., 1987; рис. 5.1].

Совсем недавно в этой зоне был открыт еще один уникальный тип LTP - калий-зависимой, для развития которой требуется длительная блокада калиевых каналов [Aniksztejn, Ben-Ari, 1991]. Добавление тетраэтиламмония (25 мМ) в инкубационную среду увеличивало длительность ВПСП до нескольких часов. Эффект блокировался антагонистом Ca^{2+} каналов - флунаризином и не начинался в присутствии CNQX. Механизм развития данной формы LTP пока не ясен, не установлено, возможно ли "изолированное" ее возникновение, или она является частью более общего механизма LTP.

В заключении остановимся на анализе работ, посвященных вопросам участия в развитии длительной потенциации других медиаторных систем. Число подобных исследований весьма ограничено, определенной системы взглядов по данному вопросу пока не существует, а имеющиеся сведения носят характер единичных наблюдений.

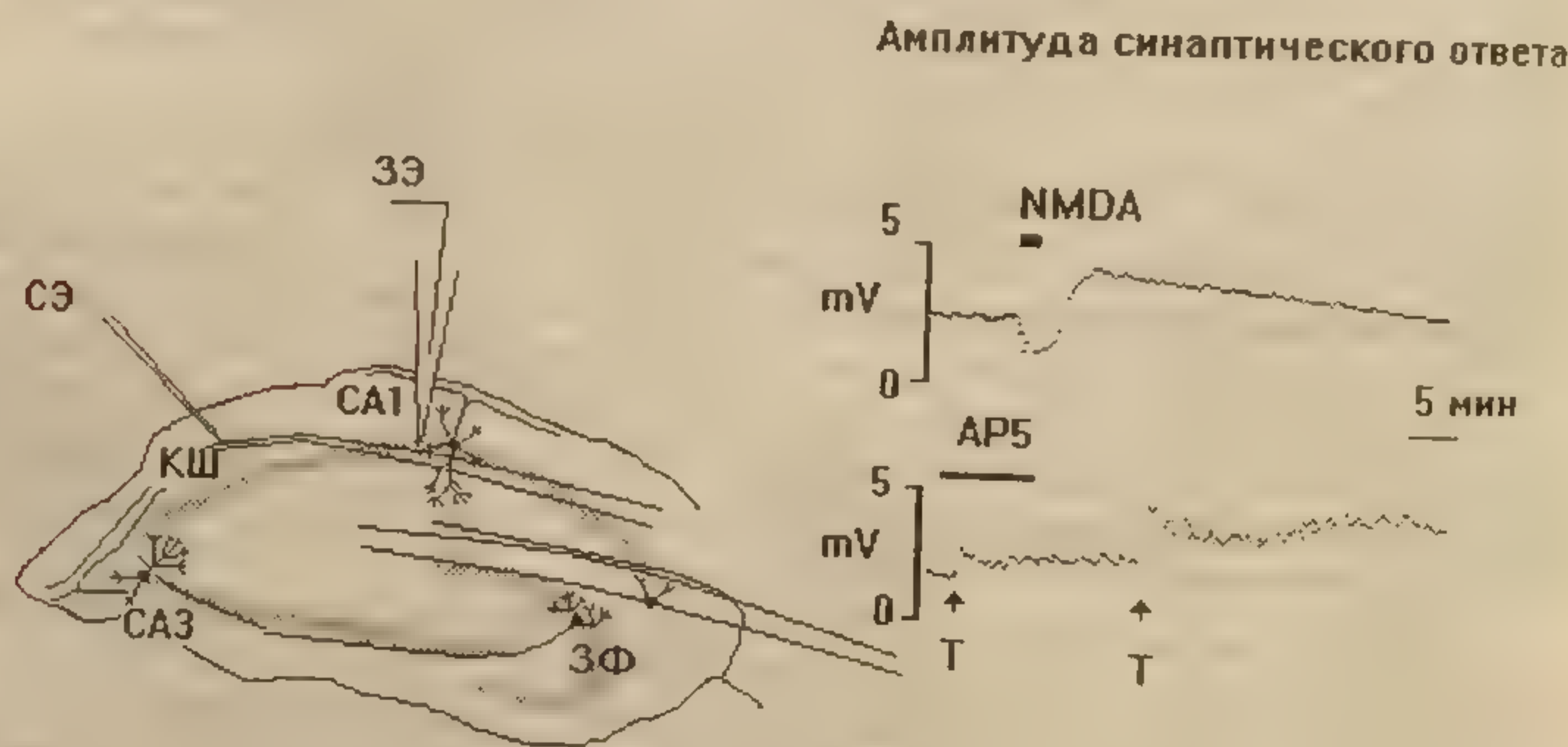


Рис.5.1. Схема регистрации долговременной потенциации на нейронах зоны CA1 гиппокампа. Внизу показано изменение внутриклеточного потенциала нейрона зоны CA1 в ответ на низкочастотную (0,033 Гц) стимуляцию коллатералей Шаффера (контроль) и после тетанической (100 Гц) стимуляции волокон. Справа показаны ответы нейронов на аппликацию NMDA и AP5 соответственно (Collingridge et al., 1983).
Условные обозначения: СЭ - стимулирующий электрод; ЗЭ - записывающий электрод; CA1, CA3 - зоны гиппокампа; КШ - коллатерали Шаффера; ЗФ - зубчатая фасция; Т - тетанус.

В частности, на периферических ганглиях позвоночных показано, что сверхмаксимальная стимуляция (20 Гц, 20 сек) преганглионарного волокна верхнего шейного ганглия вызывает LTP, длящуюся часы [Johnston et al., 1992]. Показано, что данный процесс напрямую зависит от увеличения выброса ацетилхолина из пресинаптических окончаний и активации никотинчувствительных рецепторов (потенциация развивается после быстрой волны никотинового ВПСР) [Levin et al., 1990].

На модели симпатического ганглия лягушки также показано возможность появления LTP после быстрого ВПСР при тетанической стимуляции преганглионарных волокон (33 Гц, 2-10 сек) или длительной (30 мин) инкубации ганглия в среде, содержащей адреналин [Балабан и др., 1992]. Данный тип LTP вызывается изопротеренолом или цАМФ и блокируется пропранололом, что свидетельствует о его постсинаптической природе и участии в его развитии β -адренорецепторов.

В ряде работ, выполненных на препаратах гиппокампальной формации отмечается наличие нейромодулирующего влияния на глутаматергическую систему в зоне СА3 холинергических входов из медиального септума [Cain, 1988], норадренергических волокон из синего пятна [McGaugh et al., 1988] и серотонинергических путей из *n. raphe magnus* [Gardette, Crepel, 1993]. Кроме того установлено присутствие в зоне синаптических контактов диорфина и энкефалина [Monnet et al., 1992].

В работах Fisher и Johnston [1990a] показано, что β -адреностимуляция увеличивает, а пропранолол снижает амплитуду, длительность и вероятность индукции LTP, что свидетельствует о важности норадренергической активации для развития LTP. Однако это утверждение не является абсолютным и зависит, в свою очередь, от активности других медиаторных систем, в частности ГАМКергической. Так, установлено, что добавление в среду бикукулина восстанавливает развитие LTP в условиях ее депрессии вызванной введением пропранолола (механизм не ясен) [Monnet et al., 1992].

В противоположность эффектам норадреналина, агонисты М-холино-рецепторов блокируют индукцию LTP [Fisher, Johnston, 1990], не влияя, однако, на ее течение. Вероятным местом модуляторного действия ацетилхолина являются потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа (высокопороговые) [Grover, Teyler, 1990].

Имеются единичные наблюдения о модулирующем влиянии на развитие LTP других рецепторных систем. Сообщается об ингибирующем действии налоксона [McGaugh et al., 1988], препаратов бензодиазепинового ряда, амилорида и мидазолама [Tomaz et al., 1992].

Отдельно следует остановиться на роли ГАМКергической системы в процессах развития длительной потенциации в нейронах гиппокампа (рис. 5.2). Многочисленными работами было показано, что однократное и низкочастотное раздражение пресинаптических волокон не позволяет добиться индукции LTP. Лишь длительная высокочастотная стимуляция приводит к стойкой деполяризации клетки и открытию каналов NMDA типа [Coan, Collingridge, 1988]. Скорость нарастания LTP напрямую зависит от концентрации ионов магния и активности ГАМК-ергических волокон [Ying-Bing et al., 1993]. Эти наблюдения позволили предположить существование компенсаторного механизма, препятствующего снижению порога индукции LTP. По всей видимости, эту роль в гиппокампе

выполняют ГАМКергические интернейроны, контактирующие с апикальными дендритами пирамидных клеток CA1 [Pongracz et al., 1992].

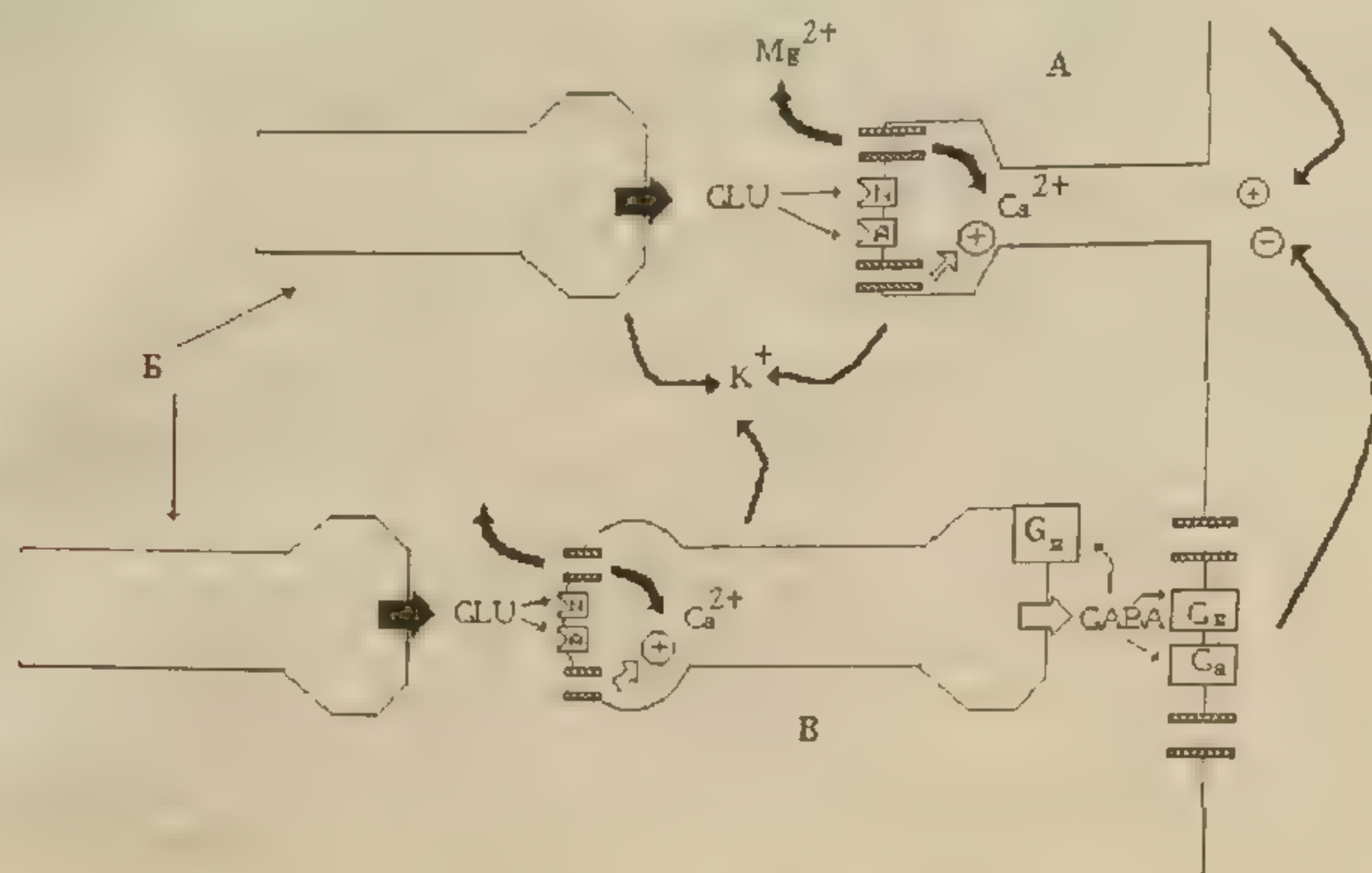


Рис.5.2. Участие ГАМКергических интернейронов в развитии долговременной потенциации в нейронах зоны CA1 гиппокампа (Collingridge and W.Singer, TIPS, 1991, Sp.report, P.45). Условные обозначения: А - апикальный дендрит пирамидного нейрона; Б - коллатерали Шافфера; В - ГАМК-ергический ингибирующий вставочный нейрон.

Первичная сочетанная активация пирамидных нейронов зоны CA1 и ГАМК-ергических интернейронов, имеющая место при низкочастотной стимуляции, ограничивает деполаризацию постсинаптической мембраны. Увеличение частоты стимула приводит к снижению активности ГАМКергического звена (за счет активации пресинаптических ГАМК_В терминалей), достаточной для снятия магниевого блока деполаризации глутаматергического нейрона и развитию LTP [Collingridge, 1989b].

Таков, по мнению большинства исследователей, механизм индукции LTP. Относительно же механизма ее поддержания, единого мнения до настоящего времени не существует. По-всей видимости, имеется несколько путей, общим моментом которых является длительная трансформация вольт-амперных характеристик постсинаптической мембраны, сопровождающаяся стойким повышением уровня выброса глутамата из пресинаптического звена. Среди возможных кандидатов можно назвать кальцийзависимую протеинкиназу С, фосфолипазу С, связанную с активацией метаболитного рецептора, арахидоновую кислоту [Linden et al., 1988; Muller et al., 1988]. Lynch и Baudry [1992] предполагают возможное участие внутриклеточной протеазы - кальпаина - переходящего под действием ионов кальция в спектрин-подобный белок фодрин, приводящий к перестройке цитоскелета и изменению характеристик проводимости каналов постсинаптических рецепторов (рис.5.3).

Рассмотренный на примере гиппокампа механизм нейрональной пластичности наблюдается практически во всех нейрональных структурах в период их онтогенетического развития. В дальнейшем происходит его редукция (и соответствующее уменьшение числа NMDA рецепторов). И лишь структуры,

ответственные за процессы, связанные с поддержанием высокого уровня нейрональной пластичности (гиппокамп, таламус, неокортекс), сохраняют высокий уровень NMDA рецепции на протяжении практически всей жизни.

В многочисленных исследованиях было установлено существование в мозжечке процесса, близкого по механизму к процессу длительной потенциации в нейронах гиппокампа и обратного ему по знаку. В последствии этот феномен получил название долговременной депрессии, или long term depression (LTD). Показано, что при сочетанной активации афферентных входов мозжечка наблюдается длительное угнетение клеток Пуркинье, основного вида нейрональной пластичности в этом регионе мозга [Hearn et al., 1986].

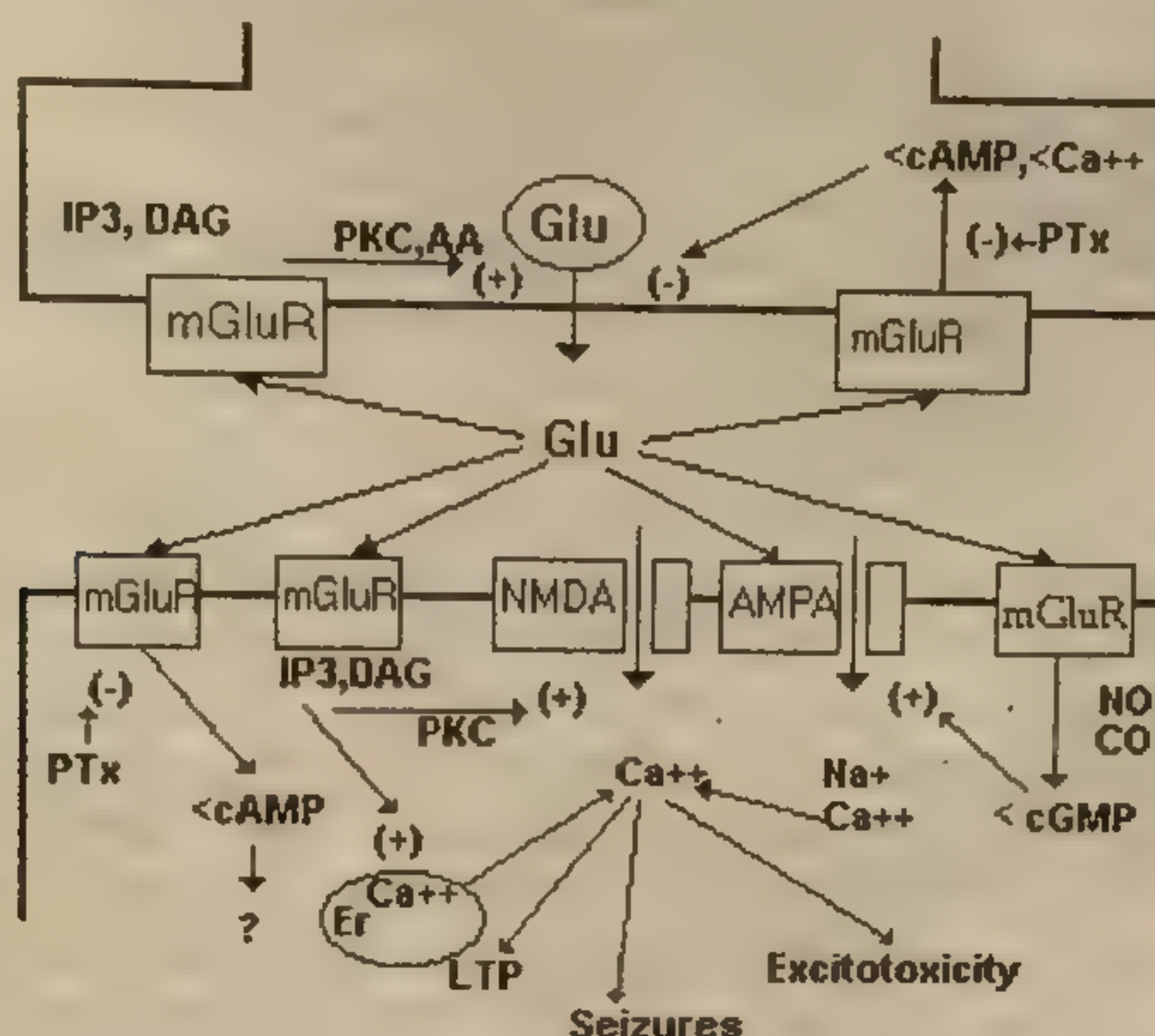


Рис.5.3. Субклеточные механизмы межрецепторного взаимодействия в глутаматматергическом синапсе (Schoepp, 1994).

При изучении механизма LTD было показано, что депрессия обусловлена снижением эффективности ответа AMPA рецепторов, в основном определяющих ВПСП клеток Пуркинье. Предполагают, что активация лазающих волокон приводит к временной перегрузке клеток вошедшим через потенциалчувствительные каналы кальцием, а активация на этом фоне AMPA рецепторов параллельными волокнами и приводит к депрессии [Collins, 1982].

Среди кандидатов в субклеточные мессенджеры предлагается протеинкиназа С (форболовый эфир усиливает депрессию), кальций (введение его хелаторов предотвращает развитие LTD), NO-цГМФ система (активация параллельных и лазающих волокон приводит к увеличению содержания NO) [Hori et al., 1991].

В последнее время важное место в индукции LTD уделяется метаботропным рецепторам. Ранее было показано, что 1R,3S-ACPD - агонист метаботропного рецептора - приводит к десенситизации AMPA-чувствительной терминали, что подтверждается, например, наблюдаемым в эксперименте усилением депрессии при сочетанном введении AMPA и 1R,3S-ACPD. Предполагают, что активация через систему NO-цГМФ протеин киназы С приводит к фосфорилированию AMPA рецептора и его последующей десенситизации [Sutor, Hablitz, 1989].

Интересные результаты о связи метаботропного и NMDA зависимого ответов нейронов при активации мшистых волокон мозжечка получены в работе [Ying-Bing et al., 1993]. Показано, что 1R,3S-ACPD потенцирует ответы клеток на раздражение мшистых волокон с медианой эффективной дозы 4.4 мкМ. Эффект блокируется антагонистом NMDA - D-AP5, но не антагонистом метаботропного рецептора AP-3. Квисквалат оказывает двухфазное действие, вызывая сначала блокаду эффекта с последующей D-AP5 чувствительной потенциацией [Pongracz et al., 1992].

Полученные результаты свидетельствуют, что агонисты метаботропного рецептора приводят к потенциации NMDA-рецепторного ответа при раздражении мшистых волокон и напрямую связаны с развитием LTD клеток Пуркинье. Отсутствие влияния внутриклеточных мессенджеров скорее всего свидетельствует о влиянии AMPA и метаботропного рецепторов на активность ответа через изменение мембранного потенциала клеток.

5.5. Болевая чувствительность

Подавляющее большинство раздражений, поступающих в ЦНС по афферентным возбуждающим волокнам, опосредуется активацией ВАКергических нейронов. Значительная часть этих импульсов, включая тактильные, кинестетические, термические и ноцицептивные раздражения проходит по волокнам афферентного звена спинного мозга при неизменном участии ВАК.

Многочисленные электрофизиологические, биохимические и поведенческие экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ВАК, являясь медиаторами болевой чувствительности на спинальном уровне, участвуют в передаче возбуждения с низкопороговых афферентов на нейроны первого и второго слоев заднего рога спинного мозга [Yoshimura, Jessel, 1990; Salt, Hill, 1986; Mayer, Westbrook, 1987; Woolf, Thompson, 1991], при этом рецепторы ВАК опосредуют ответ на термическую, механическую, химическую (формалин), а также ишемическую болевые стимуляции [Sher, Mitchell, 1990; Dougherty, Willis, 1991].

Высокая концентрация глутамата обнаружена в спинномозговом ганглии, задних корешках, в первом и втором слое заднего рога [Willis, Coggeshall, 1991]. О существовании эндогенной ВАКергической системы контроля боли на спинальном уровне может свидетельствовать также увеличение внеклеточного уровня глутамата после болевой стимуляции [Skilling et al., 1988].

Выяснению роли отдельных типов рецепторов ВАК посвящено много работ [Salt, Hill, 1986; Headley et al., 1987a, 1987b; Yaksh, 1989; Dickenson, Sullivan, 1990; Tolle et al., 1990; Raigorodsky, Urca, 1990; Dougherty Willis, 1991; Ren et al., 1992b]. Лиганды NMDA рецепторов модулируют ответы глубоких слоев на стимуляцию афферентных волокон с малым диаметром (С-волокна). Рецепторы неNMDA типа расположены на нейронах всех слоев, отвечающих на стимуляцию Аδ- и С-волокон [Dickenson, Sullivan, 1991a]. В сети спинальных промежуточных нейронов преимущественно встречаются NMDA рецепторы [Willis, Coggeshall, 1991].

Несмотря на установленную полимодальность большинства Аδ- и С-афферентов [Lynn, Carpenter, 1982], передача информации от специфических ноцицепторов опосредуется NMDA рецепторами, а от чувствительных механорецепторов - неNMDA рецепторами [Morris, 1984; Dougherty, Willis, 1991]. Кроме того предполагается, что NMDA рецепторы вовлечены в полисинаптическое проведение сигналов, а неNMDA - моносинаптическое [Dickenson, Sullivan, 1990; Willis, Coggeshall, 1991]. NMDA рецепторы расположены на интернейронах второго порядка, активируемых при стимуляции волокон А- и С-типов, в то время как неNMDA рецепторы находятся на первичных синапсах

афферентов [Davies, Watkins, 1983]. Блокада NMDA рецепторов *in vivo* [Raigorodsky, Urca, 1990] и *in vitro* [Jeftinija, 1989] подавляет проведение ноцицептивной информации через волокна малого диаметра. В передаче информации от передних рогов спинного мозга и, следовательно, в сегментарной регуляции моторной функции участвуют преимущественно рецепторы NMDA типа [Headley et al., 1987a].

Показано, что интратекальные инъекции ВАР (NMDA, ODAP, каиновая и квискваловая кислоты) вызывают типичное для болевого воздействия поведение животных (pain behaviour) [Raigorodsky, Urca, 1987, 1990; Aanonsen, Wilcox, 1987]. Это связано с тем, что они вызывают снижение болевых порогов. Для некоторых из них (например, NMDA) в зависимости от дозы и времени введения веществ, наблюдалась двухфазность эффекта: возникающая первоначально гипералгезия сменялась гипоалгетическим действием вещества [Raigorodsky, Urca, 1987; Besspalov et al., 1994a].

Такой же двухфазный эффект возникает и при системном введении NMDA в субсудорожных дозах [Беспалов и др., 1995]. При этом на действие NMDA в первой, гипералгетической, фазе не влияли такие препараты, как кетамин, фенциклидин, морфин, налоксон и другие, и лишь израдипин ослаблял его.

В противоположность агонистам, антагонисты рецепторов ВАР как NMDA, так и неNMDA типов при интратекальном введении дозозависимо повышают пороги болевого реагирования в тестах "отдергивания хвоста", "горячая пластина", клипсирования и вокализации [Aanonsen, Wilcox, 1987; Raigorodsky, Urca, 1990]. Причем этот эффект не зависит от моторных расстройств, вызываемых этими веществами, так как гипоалгетическое действие антагонистов ВАР проявляется в тестах, не требующих нормальной моторной функции [Cahusac et al., 1984].

Однако эффект соединений зависит от типа болевого воздействия. Например, установлено отсутствие гипоалгетического действия МК-801 на модели термического болевого раздражения [Nasstrom et al., 1993].

Большое значение имеет ВАРгическая передача в процессах длительного болевого реагирования, а именно в регуляции восприятия боли, индуцированной химически или возникающей после повреждения нерва. Было показано, что антагонисты ВАР (преимущественно NMDA типа) эффективно ослабляют химически индуцированное болевое поведение [Ren et al., 1992]. О вовлечении NMDA рецепторов в механизмы быстрого и пролонгированного реагирования на химический ноцицептивный стимул свидетельствуют данные о том, что химически вызванное болевое раздражение вызывает быструю активацию NMDA рецепторов, которая сохраняется около 1 часа. Наблюдающаяся при этом повышенная активность нейронов глубоких слоев задних рогов не уменьшается при отсроченном (после химического раздражения) применении антагонистов NMDA рецепторов [Haley et al., 1990].

В ряде работ сообщается о влиянии на ноцицепцию модуляторов NMDA рецепторного комплекса (глицин, D-серин, Zn^{2+} , Mg^{2+} , спермин и др.) [см., например Raigorodsky, Urca, 1990; Coderre, Van-Empel, 1994a]. Кроме того, возможно взаимодействие различных типов лигандов рецепторов ВАР. Например, отмечено модулирующее влияние квискваловой и каиновой кислот на NMDA-индуцированную гипералгезию [Raigorodsky, Urca, 1987; Turski et al., 1990a].

Помимо спинального уровня, ВАРгическая система участвует в эндогенных механизмах регуляции болевой чувствительности и на супраспинальном уровне. Мишенью для действия ВАР на супрасегментарном уровне является центральное околотоводопроводное вещество (ЦОВ), откуда через большое ядро шва (БЯШ) идут нисходящие серотонинергические пути в спинной мозг. Авторадиографически

показано, что связь между ЦОВ и БЯШ имеет ВАКергическую природу [Wiklund et al., 1988]. Локальное введение глутамата в ЦОВ приводит к повышению активности БЯШ [Behbehani, Fields, 1979]. Введение ВАК в ЦОВ приводит к выраженной анальгезии, причем этот эффект опосредован рецепторами ВАК, так как обращается при введении их антагонистов [Behbehani, Fields, 1979; Gold et al., 1990; Jacquet, 1988].

Изложенные выше данные касались преимущественно участия ВАКергической системы в передаче ноцицептивного стимула. Однако этот процесс характеризуется взаимодействием многих медиаторных систем. Особо следует отметить взаимодействие ВАКергической системы с ГАМКергической [Aanonsen, Wilcox, 1989] и опиатергическими системами [Belcher, Ryall, 1978].

5.6. Восприятие сенсорной информации

ВАКергическая система играет также важную роль в восприятии сенсорной информации различной модальности. Эта медиаторная передача опосредует проведение импульсов, связанных с восприятием обонятельных, вестибулярных, зрительных, тактильных и других сигналов [Greenamyre et al., 1984; Mayer, Westbrook, 1987; Willis Coggeshall, 1991].

Одной из интересных систем, включающей metabotropic рецепторы ВАК, является передача зрительного стимула. Ключевой этап этого процесса - выделение контрастов в поступающей зрительной информации. Это происходит на уровне биполярных клеток, разделяющих прохождение зрительного сигнала на два пути - через ON- или OFF-биполярные клетки. Данные последних лет показывают, что L-AP4-чувствительные metabotropic рецепторы ВАК mGluR6 ответственны за синаптическую передачу с фоторецепторов на ON-биполярные клетки [Shiells, Falk., 1990]. Попадание света на фоторецепторы приводит к стимуляции фосфодиэстеразы и падению уровня цГМФ. Это, в свою очередь, приводит к гиперполяризации фоторецепторов в результате закрытия цГМФ-зависимого ионного канала и уменьшению выброса глутамата в синаптическую щель. Уменьшение количества медиатора приводит к тому, что система mGluR6 - G-белок - фосфодиэстераза в ON-биполярных клетках находится в неактивном состоянии, в них возрастает концентрация цГМФ и стимулируется цГМФ-зависимый ионный канал, что приводит к деполяризации ON-биполярной клетки. Поэтому увеличивается из ее пресинаптической мембраны выброс глутамата, который и возбуждает все амакриновые и ганглионарные клетки, передающие возбуждение в мозг [Nakanishi et al., 1994].

Через metabotropic рецептор mGluR2 происходит передача сигналов между митральными и гранулярными клетками в обонятельной луковице. Это было установлено при исследовании действия специфического агониста рецепторов mGluR2 DCG-IV [(2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-дикарбоксициклопропил)глицин] [Ishida et al., 1993] на ГАМКергическую передачу с гранулярных на митральные клетки [Hayashi et al., 1993]. При электрической стимуляции гранулярных клеток в митральных клетках возникает ГАМК-индуцированные ингибиторные постсинаптические токи. При активации рецепторов mGluR2 прибавлением DCG-IV эти токи отчетливо уменьшались, то есть активация рецепторов mGluR2 в гранулярных клетках уменьшает ГАМКергическую передачу от гранулярных к митральным клеткам. Следовательно, митральные клетки могут "защищаться" от ГАМКергического ингибирования выбросом глутамата, который будет активировать рецептор mGluR2 на пресинапсе гранулярных клеток и снижать ГАМКергическую передачу в обратном направлении. У гранулярных клеток нет аксонов, они образуют многочисленные синаптические контакты с несколькими

митральными клетками. Так как активация mGluR2 защищает возбужденные митральные клетки от ингибирования, то можно предположить, что эта активация ограничивается синапсами возбужденных митральных клеток, и таким образом поддерживается латеральное ингибирование невозбужденных митральных клеток. Этот механизм позволяет поддерживать отношение сигнал-шум между возбужденными митральными клетками и их соседями, что и позволяет выделять и разделять различные обонятельные стимулы [Nakanishi et al., 1994].

В отличие от других систем передачи нервного импульса, фоторецепторы и обонятельные рецепторы продуцируют градуированный сигнал. При прямой передаче этих сигналов в центральные части мозга возможны многочисленные ошибки. Для предотвращения этого сенсорные системы отбирают сигнал не по абсолютной величине, а по контрастности. Этот процесс требует специального механизма, в котором одну из важнейших ролей играют метаботропные рецепторы ВАК.

Мы рассмотрели лишь часть данных по участию ВАКергической системы в регуляции жизнедеятельности организма. Однако роль ВАК в ЦНС далеко не ограничивается этими функциями. Среди прочего отметим, что глутаминовая кислота служит основным медиатором в вестибулярной системе, где представлены в основном рецепторы AMPA/KAI типа [Smith, Darlington, 1994], важна роль ВАКергической передачи и в регуляции функций нейроэндокринной системы [Brann, Mahesh, 1994; Brann, 1995].

Завершая обзор литературных данных, посвященных изучению роли глутаматергической системы в регуляции основных физиологических процессов, следует отметить, что исследования в этой области, носящие пока большей частью фундаментальный характер, неизбежно приведут к более глубокому пониманию принципов функционирования данной медиаторной системы, что позволит создать новые эффективные лекарственные препараты, обладающих глутаматергической активностью. Оценке перспектив этого направления и стоящих перед ним проблем посвящены последующие главы нашей книги.

ГЛАВА 6. РОЛЬ ВАКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАЗВИТИИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

В основе развития различных патологических состояний, вызванных нарушениями в функционировании ВАКергической нейротрансмиссии, лежит, как правило, либо а) перевозбуждение нейрона при кратковременном интенсивном воздействии на него медиатора, или б) гибель нейрона при долговременном воздействии медиатора. В первом случае возникают судорожные припадки, во втором - различные нейродегенеративные изменения.

6.1. Судорожные состояния

Развитие судорожного припадка связано с переходом нормально функционирующих нейронов в состояние пароксизмальной активности. Если вспомнить, что ВАКергическая система является основной системой передачи возбуждения в ЦНС, то связь ее с возникновением и развитием судорожных состояний становится очевидной.

Собственно говоря, с этого и начались исследования роли дикарбоновых аминокислот в ЦНС. Как уже указывалось во введении, первой работой по этой тематике была работа Hayashi [1952], который показал, что локальные аппликации глутамата и аспартата на кору мозга собак и обезьян вызывают появление клонических судорог. В настоящее время установлено, что аналогичный эффект возникает при действии абсолютно всех кислых аминокислот, агонистов рецепторов ВАК разных типов, что и послужило причиной появления названия "возбуждающие аминокислоты". Судороги, возникающие как после прямого введения ВАК в мозг, так и после системного введения [Stone, Javid, 1983], блокируются соответствующими антагонистами [Dingledine et al., 1991].

В исследованиях Wilson и соавт. [1985] показано, что высокочастотная стимуляция stratum radiatum вызывает развитие эпилептиформных разрядов в зоне СА3 гиппокампа. Аналогичные данные были получены Slater и соавт. [1985] на нейронах зоны СА1 (рис.6.1). Показано, что сочетанное локальное введение ВАК и антагонистов ГАМК-рецепторного комплекса приводит к выраженному возбуждению нейрональных структур и в большинстве случаев заканчивается развитием генерализованного судорожного припадка. Наиболее выраженное проконвульсивное действие наблюдается у селективных агонистов как NMDA, так и AMPA/каинатных рецепторов, что свидетельствует о вовлечении обоих подтипов рецепторов в генерацию судорожного разряда.

Однако существуют некоторые различия в динамике вызванных потенциалов различных типов рецепторов ВАК, обусловленные их кинетическими характеристиками. Показано, что первичная индукция эпилептиформных разрядов гиппокампальных нейронов связана с активацией рецепторов AMPA типа, в то время как поддержание и развитие стойкой судорожной активности клетки определяется NMDA рецепторным комплексом [Stasheff et al., 1989]. Становится понятным, почему антагонисты AMPA оказываются максимально эффективными при введении до начала судорожного разряда и лишь незначительно снижают его силу на фоне развившегося припадка [Kawasaki et al., 1990].

Рассуждая о роли рецепторов ВАК в механизме развития эпилептического припадка, следует привести результаты исследования Lahtinen и соавт. [1993], изучавших динамику рецепторного связывания меченого тритием глутамата со структурами гиппокампального комплекса при продолжительной односторонней стимуляции перфорантного пути. Авторам удалось установить значительное снижение количества мест связывания глутамата, сопровождающееся глиозом и

заканчивающееся в итоге склерозом пирамидного слоя и stratum radiatum ипсилатерального гиппокампа. Одновременно с этим наблюдалось билатеральное увеличение количества участков связывания в молекулярном слое зубчатой фасции. Полученные данные согласуются с результатами изучения биоптатов мозга больных височной эпилепсией и позволяют, таким образом, с большой вероятностью изучать и прогнозировать механизм развития и лекарственной

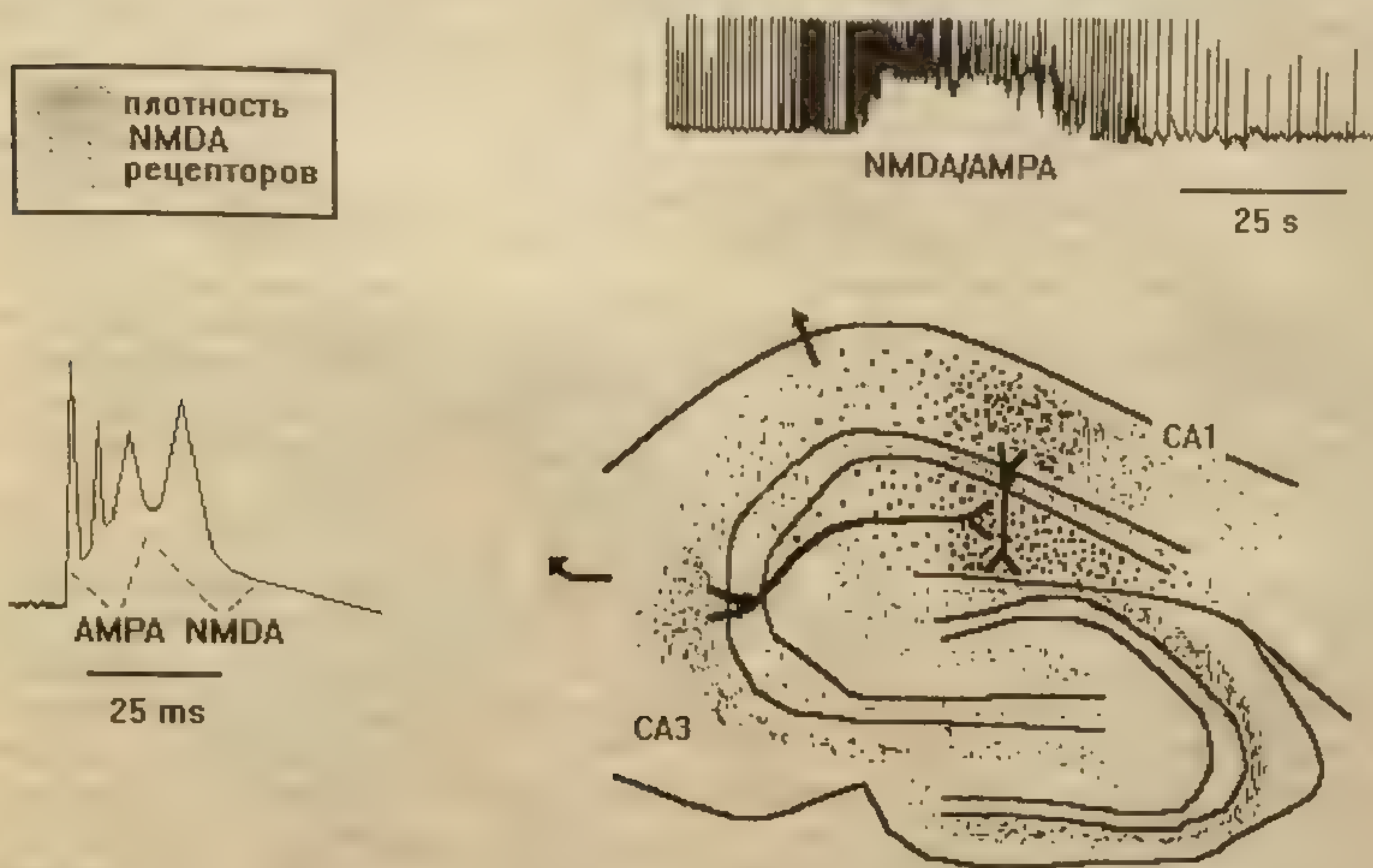


Рис.6.1. Роль NMDA и AMPA рецепторов в генерации судорожного разряда нейронов зоны CA1 при электрической стимуляции зоны CA3 гиппокампа.

коррекции этой формы эпилепсии на экспериментальной модели патологии. Кроме того, полученные данные подтверждают большое значение в развитии височной эпилепсии нарушений NMDA рецепторной передачи в мозге.

В работах группы ученых под руководством Ungerstedt методом внутримозгового микродиализа изучена динамика уровня 13 аминокислот в межклеточном пространстве у больных при спонтанном и вызванном эпилептическом приступе с одновременным мониторингом электрокортикограммы. Наблюдения показали резкое (1,3 - 79,0 раз) по сравнению с базальным уровнем увеличение в патологической зоне со 2 по 6 минуты эпилептического приступа выброса глутаминовой, аспарагиновой кислот, глицина и серина, при незначительных сдвигах в содержании других аминокислот. Вне эпилептического приступа содержание веществ оставалось практически неизменным [Carlson et al., 1992].

Результаты проведенных исследований позволяют предположить существование связи между состояниями судорожной готовности у животных и людей и

дисбалансом медиаторных пулов, а также чувствительностью рецепторов возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем [Meldrum, 1991a].

Гораздо труднее установить наличие причинной связи между увеличением уровня ВАК и началом судорожного разряда. Хотя имеются определенные теоретические предпосылки для подобного предположения, экспериментальных данных на этот счет получено пока недостаточно и они весьма противоречивы. В работах [Zhang et al., 1991; Minamoto et al., 1992] сообщается об отсутствии изменений в уровне внеклеточного глутамата в предсудорожный период на различных экспериментальных моделях, даже в присутствии ингибиторов обратного захвата аминокислоты. Напротив, исследованиями [Jarvie et al., 1990; Leach et al., 1985] на моделях *in vivo* и *in vitro* установлено увеличение выброса глутамата в структурах гиппокампа и височной коры у крыс с повышенной судорожной готовностью. Данный вопрос требует более детального изучения, однако сам факт участия ВАК в механизме развития и поддержания судорожной готовности не вызывает сомнений.

Важными для понимания механизма эпилептогенеза стали наблюдения о практической идентичности условий электрической стимуляции гиппокампальных входов, приводящих к развитию судорог и индукции процесса длительной потенциации. Эти данные позволили предположить существование эндогенных предпосылок развития патологического судорожного процесса.

Ранее мы уже говорили о возможности перехода гиппокампальных и других, связанных с развитием LTP, нейронов при длительной высокочастотной стимуляции в состояние эпилептиформной активности, характеризующееся сменой регулярных спайковых разрядов высокочастотной пачечной активностью взрывного типа. Предполагается, что подобный переход, являющийся следствием активации рецепторных структур, ответственных за развитие LTP (в основном рецепторы NMDA типа), наблюдается как вариант нормы в большинстве исследованных зон мозга. Однако многократное раздражение при отсутствии эффективных компенсаторных механизмов приводит к срыву осцилляторной активности нейрона и развитию судорог. Несомненно, развитие судорожного процесса носит мультимедиаторный характер, однако представленные выше результаты позволяют говорить о ключевой роли ВАК-ергических структур в его развитии. Поэтому не вызывает сомнений актуальность поиска высокоэффективных противосудорожных средств среди химических соединений, обладающих сродством к ВАКергическим рецепторам. Этому вопросу посвящены многочисленные исследования, на анализе которых мы остановимся ниже.

6.2. Гипоксия мозга.

Нейротоксическому действию эндогенных ВАК принадлежит важная роль в каскадном процессе повреждения нейрона при различных патологических состояниях, включая гипоксию. Хорошо известна высокая чувствительность нервной ткани к нарушению кислородного баланса различного генеза. Морфологические исследования свидетельствуют о быстрой и массивной гибели нейронов при ишемии. В наибольшей степени подвержены воздействию гипоксии структуры, ответственные за выполнение тонких интегративных функций (новая кора, гиппокамп).

Так, на модели 8-лучевого радиального лабиринта показано, что 20-ти минутная ишемия мозга, вызванная перевязкой сонных артерий, приводит к выраженным нарушениям рабочей памяти у крыс [Chapman, 1991]. При гистологическом исследовании установлено наличие очагов некроза в зонах CA1 гиппокампа, субикулуме и дорсальном отделе хвостатого ядра. По данным работы

[Davis et al., 1986] наблюдается практически полная гибель пирамидных нейронов гиппокампа, что, по-видимому, и определяет тяжесть мнестических расстройств у животных.

В работах [Simpson et al., 1992; Canhaio et al., 1994] сообщается о значительном увеличении содержания возбуждающих аминокислот в межклеточном пространстве с первых минут ишемии. Учитывая высокую нейротоксичность ВАК, можно и здесь предположить их участие в гипоксическом повреждении нервных клеток. Действительно, использование веществ - блокаторов ВАКергической нейротрансмиссии позволяет значительно снизить скорость и глубину ишемических повреждений нейронов [Graham et al., 1993]. Аналогичное действие оказывают тормозные аминокислоты (таурин, ГАМК), что позволяет говорить о необходимости баланса возбуждающих и тормозных влияний как эндогенного механизма противоишемической защиты [Lekieffre et al., 1992].

6.3. Нейротоксические свойства ВАК.

Возбуждающие аминокислоты, как нейромедиаторы, играют важную роль во многих нормальных физиологических функциях. Однако при развитии некоторых патологических состояний решающую роль начинает играть их способность вызывать гибель нейрональных клеток - нейротоксичность (excitotoxicity). Первые экспериментальные данные о нейротоксичности глутаминовой кислоты были получены задолго до открытия ее медиаторной роли. Еще в 1957 году Lukas и Newhouse впервые описали дегенеративные изменения в нейронах сетчатки у мышей при системном введении высоких доз L-глутамата. Однако лишь систематические исследования в этой области, предпринятые в 70-х годах и связанные с открытием рецепторов ВАК позволили раскрыть механизм, лежащий в основе этого явления.

После пионерских работ Olney [1978; 1981], установившего глутаматергическую природу ряда нейродегенеративных заболеваний и определившего его в качестве фактора "эндогенной токсичности", стал интенсивно изучаться механизм нейротоксичности глутамата и его связь с основными фармакодинамическими эффектами этого соединения.

При внутрицентральной введении высокие дозы глутамата вызывают реакции психомоторного возбуждения, сопровождающиеся нарушениями регуляции вегетативных функций и заканчивающиеся в большинстве случаев генерализованным судорожным припадком [Meldrum, Garthwaite, 1990]. Однако наблюдать феномен нейротоксичности *in vivo* при использовании самой L-глутаминовой кислоты удается далеко не всегда, так как необходимо использовать очень высокие его концентрации (порядка миллимолярных) [Garthwaite, 1985]. Причина этого заключается в том, что в глиальных клетках и пресинаптических окончаниях существует высокоэффективная система захвата глутамата, препятствующая накоплению его высоких концентраций. Поэтому значительно проще наблюдать феномен нейротоксичности при использовании синтетических или природных аналогов (NMDA, AMPA, каиновая кислота и др.), захват которых этими системами не столь эффективен [Kohler, Schwarcz, 1983].

Доказательством нейротоксичности эндогенных возбуждающих медиаторных аминокислот служит тот факт, что при длительной электрической стимуляции афферентных волокон наступает дегенерация глутаматчувствительных рецепторных нейронов - при продолжительной электрической стимуляции перфорантного пути *in vivo* возникают необратимые дистрофические изменения в зонах CA1 и CA3 гиппокампа [Sloviter, 1983; Scharfman, Schwartzkroin, 1989]. Аналогичная картина наблюдается и при перфузии срезов гиппокампа раствором.

лишенным ионов магния [Watson et al., 1989]. Доказательством также может служить недавно установленный факт нейротоксичности L-транс-пирролидин-2,4-дикарбоновой кислоты, ингибитора обратного захвата L-глутамата [Barks, Silverstein, 1994].

По данным Reynolds [1990] структурами, наиболее подверженными влиянию избыточных доз L-глутаминовой кислоты, оказались гипоталамус, гиппокамп и миндалина - т.е. образования с характерно высокой плотностью рецепторов ВАК. Исследования с использованием антагонистов рецепторов ВАК показали, что в некоторых тканях нейротоксичность ВАК связана с активацией NMDA рецепторов, в других - с AMPA и каинатными рецепторами [Meldrum, Garthwaite, 1990].

К настоящему времени накоплен богатый экспериментальный материал, доказывающий участие эндогенного пула возбуждающих медиаторных аминокислот вообще, и глутамата в частности, в развитии нейродегенеративных изменений нейронов мозга, сопровождающих такие патологические состояния как эпилептический статус, церебральная гипоксия, нейроинтоксикация, болезни Гентингтона, Паркинсона, Альцгеймера и некоторые другие [Раевский, Георгиев, 1986; Meldrum, Garthwaite, 1990; Beal, 1986; Ferrante et al., 1993; Haglid et al., 1994].

Действие ВАК на нейроны приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция, что и является одной из основных причин нейротоксичности этих соединений. Если глутамат и NMDA влияют как на входящий кальциевый ток, так и на высвобождение кальция из внутриклеточных депо, то AMPA и каинат влияют преимущественно на входящий ток, практически не влияя на процессы высвобождения [Schousboe et al., 1994]. О важной роли ионов кальция в нейротоксическом действии ВАК свидетельствуют данные о том, что нейропротекторное действие оказывает не только антагонист AMPA рецепторов NBQX, но и блокатор кальциевых каналов L-типа нимодипин [Prehn et al., 1995].

При AMPA- или каинат-вызванной нейротоксичности пусковым моментом всего процесса является активация AMPA и каинатных рецепторов, приводящая к усилению поступления в клетку ионов натрия и обеспечивающая кратковременную деполяризацию постсинаптической мембраны. Затем происходит снятие потенциалзависимого магниевых блока NMDA-рецепторного канала. Этот процесс, носящий долгосрочный характер, приводит к массивному поступлению ионов кальция внутрь клетки по рецепторным и потенциал-зависимым каналам и дальнейшей деполяризации постсинаптической мембраны.

В нормальных условиях на данном этапе срабатывают механизмы обратной связи (обратный захват, пресинаптическое ингибирование выброса, метаболическая утилизация медиатора, активный ионный транспорт и т.д.). Однако при нарушении нормального функционирования этих механизмов в условиях патологии, абсолютная концентрация и время пребывания медиатора в синаптической щели превышает допустимые пределы и процесс деполяризации нейрона приобретает необратимый характер. Избыточное поступление ионов кальция запускает каскадный механизм ферментативных реакций, собственно и приводящих к катаболическому повреждению нейрона. О механизмах нейротоксичности ВАК см. также [Olney, 1994].

Как уже отмечалось выше естественные механизмы утилизации L-глутаминовой кислоты обычно работают достаточно эффективно. Однако длительное применение субтоксических доз этой аминокислоты может приводить к постепенному развитию психоэмоциональной заторможенности, сопровождающейся рядом характерных неврологических симптомов: миоклонические подергивания, легкий тремор, ригидность и др. Именно с этим

связывают иногда известный "синдром китайского ресторана", обусловленный, как полагают, длительным приемом пищи, содержащей высокие дозы L-глутамата натрия, характеризующийся снижением мыслительной деятельности, нередко галлюцинаторными переживаниями и приводящий к неврологическим расстройствам, связанным с дегенеративными изменениями ЦНС [Weiss, 1989]. В этой связи вызывают интерес некоторые природные вещества, обладающие ВАКергической активностью, употребление которых с пищей может вызывать различные нейродегенеративные расстройства.

Нейротоксические свойства алиментарных ядов, обладающих ВАКергической активностью. Одним из представителей данной группы веществ является домоевая кислота. История ее открытия вызвана изучением этиопатогенеза неврологических расстройств, связанных с употреблением в пищу морских моллюсков, распространенных на западном побережье Канады. В 1987 году было установлено, что непосредственной причиной заболевания является нейротоксин, содержащийся в больших количествах в водорослях *Chondria armata* и употребляемый моллюсками в пищу (табл. 6.1). Нейротоксин, получивший название домоевой кислоты, оказался структурным аналогом каиновой кислоты и высокоселективным лигандом каинатных рецепторов. Однократное потребление больших количеств этого вещества (свыше 4 мг/кг) вызывает через несколько часов выраженное сенсомоторное возбуждение, заканчивающееся в части случаев генерализованным судорожным припадком.

Хроническое потребление домоевой кислоты характеризуется стойкими расстройствами памяти и прогрессирующей психо-эмоциональной заторможенностью. Патоморфологическое изучение мозга погибших больных показало выраженную дегенерацию нейронов гиппокампа, периформной коры, миндалины и других лимбических структур. Кроме того, наблюдалось повреждение V и VI слоев коры мозга. Локализация повреждений коррелировала с зонами наибольшей плотности каинатных рецепторов, что подтверждает "каинатный" механизм отравления домоевой кислотой [Teitelbaum J.S. et al., 1990].

Другим представителем алиментарных ядов, обладающих ВАКергической активностью, является ODAP (BOAA). Эта небелковая аминокислота была выделена из бобов *Lathyrus sativus* и обнаружена в других видах *Lathyrus* [Bell, Donovan, 1966; Rao et al., 1964]. Продолжительное употребление этих бобов в пищу вызывает клинический синдром, носящий название нейротиризм, характеризующийся спастическими расстройствами, в основе которых лежит дегенеративное повреждение моторных нейронов передних рогов спинного мозга [Padmanaban et al., 1971; Ross, Spencer, 1995]. Предполагается, что в развитии патологических повреждений принимают участие AMPA рецепторы, к агонистам которых относится ODAP [Bridges et al., 1989]. ODAP - достаточно редкий представитель ВАК, способный относительно легко проникать через ГЭБ и накапливаться в поясничных отделах спинного мозга, гиппокампе и коре головного мозга. При внутрибрюшинном введении ODAP уже через 10 минут значительные его количества обнаруживаются в нервных окончаниях [Lakshmanan, Padmanaban, 1991]. Проникновение ODAP в заметных количествах в ЦНС связано, по всей видимости, с его метаболической стабильностью [Rao, 1978].

ODAP относится к классу веществ - латирогенов, который включает и такие соединения как 2-аминопропионитрил, 2-амино-3-цианопропионовая кислота, 2,4-диаминомасляная кислота и другие [Raj, Rao, 1972], также способные вызывать латиризм. Так как сами эти соединения, в отличие от ODAP, не содержат в своих молекулах ВАКергического фармакофора, то вероятно, что их действие как

латирогенов связано не с самими нативными молекулами, а с их метаболитам, способными взаимодействовать с рецепторами ВАК [Weiss et al., 1989].

Таблица 6.1. Характеристика некоторых алиментарных ядов, обладающих ВАК-ергической активностью.

	α -Каинат	домоевая кислота	ODAP	ВМАА
Биологический источник	<i>Digenea simplex</i>	<i>Chondria Armata</i>	<i>Lathyrus sativus</i>	<i>Cycas circinalis</i>
Участок связывания, K_i	21 nM (каинат)	13 nM (каинат)	760 nM (AMPA)	
Токсичность в культуре (24 ч)	67 μ M		10-100 μ M	0,3-3 mM
Острая токсическая доза (крысы)	9-15 мг/кг	4 мг/кг	0,5 г/кг	2-4 г/кг
Хроническая токсическая доза (обезьяны)			1,1 - 1,4 г/кг	100-300 мг/кг
Неврологические синдромы		лимбические судороги, амнезия	нейротоксизм	болезнь о. Гуам

Среди жителей острова Гуам весьма распространенным является заболевание, получившее название боковой амиотрофический склероз. (БАС). Это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся снижением мышечной силы, спастичностью и связанное с дегенерацией и потерей эффекторных нейронов в спинном мозге, стволе и неокортексе [Plaitakis, 1993]. Заболевание в большинстве случаев сочетается с симптомами паркинсонизма и сенильной деменцией, и приводит обычно к смерти через 2-5 лет после начала [Plaitakis, 1990].

Причиной неврологических расстройств является употребляемая местным населением в пищу мука, приготовленная из семян *Cycas circinalis*, из которой был выделен β -N-метиламино-L-аланин (ВМАА) - смешанный агонист рецепторов ВАК, являющийся непосредственной причиной данной патологии. ВМАА может одновременно вызывать расстройства, характерные для амиотрофического склероза, паркинсонизма и сенильной деменции типа болезни Альцгеймера. Следует отметить, что по имеющимся данным не исключается наличие эндогенных причин развития БАС, связанных, в частности, с нарушением метаболизма глутаминовой кислоты и ее избытком в ликворе [Shank, Aprison, 1988].

Ранее была показана ключевая роль дефицита глутаматдекарбоксилазы в развитии оливопонтocerebellарной атрофии с последующей мультисистемной дегенерацией. Сообщается о значительном увеличении у этой категории больных уровня эндогенного глутамата, N-ацетил-аспартата и N-ацетил-аспартил-глутамата в плазме и ликворе [Plaitakis, 1984; Yamamoto, 1992a].

ГЛАВА 7. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВАКЕРГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Широкая распространенность рецепторов ВАК в различных структурах, их уникальная физиологическая роль указывают на перспективность применения соединений, влияющих на ВАКергическую медиаторную систему, в качестве эффективных лекарственных препаратов различного типа действия (противосудорожных, противоишемических, антиамнестических средств, анальгетиков и т.д.) [Раевский, 1989; Cunningham et al., 1994]. Поэтому не удивительно, что все крупнейшие фармацевтические компании мира (Glaxo Wellcome, Merck Sharp and Dohme, Sandoz, Ciba-Geigy, Lilly и др.) имеют обширные исследовательские программы, направленные на создание лекарственных средств на основе лигандов ВАК рецепторов.

Однако, несмотря на обилие селективных лигандов рецепторов ВАК, широко используемых в экспериментальной практике, до сих пор не создано ни одного клинически эффективного лекарственного средства. В таблице 7.1 приведены сведения о некоторых находящихся в настоящий момент на различных стадиях клинических испытаний и имеющих перспективы для дальнейшего клинического использования соединениях. Пока их немного, но мы попытаемся проанализировать основные тенденции и перспективы создания новых различных по показаниям лекарственных средств, в основе действия которых лежит регуляция функций рецепторов ВАК и ВАКергической системы в целом.

7.1. Противосудорожное действие

Антагонисты NMDA рецепторов. Практически сразу же после появления конкурентных антагонистов NMDA рецепторов стала изучаться возможность их использования в качестве противосудорожных препаратов. Так, например, AP7 при прямом введении в мозг проявил более сильное противосудорожное действие, нежели диазепам [Meldrum, 1985]. В настоящее время, с использованием многочисленных экспериментальных моделей, накоплено большое количество данных о выраженном противосудорожном действии антагонистов NMDA рецепторов [Meldrum, 1994]. Показано, что они проявляют противосудорожные свойства на моделях лимбических судорог, вызванных пилокарпином, модели генерализованного судорожного припадка после транскорнеального электрошока. Наличие активности, хотя и менее выраженной, установлено на модели судорог, индуцированных низкочастотной стимуляцией (6-8 Гц) таламических ядер (коррелят формы эпилептического припадка у людей типа absence) [Marescaux et al., 1992]. Вызванные судорожные разряды зоны амигдаларного комплекса (amygdala-kindled seizures - аналог парциальной эпилепсии у человека) также в значительной степени снижались при введении конкурентных антагонистов NMDA рецепторов [Cotterell et al., 1992]. Нужно отметить, что этот тип судорог остается наиболее резистентным к действию известных противосудорожных препаратов. Поэтому, с учетом того, что парциальная форма эпилепсии составляет большую долю в структуре данной патологии, поиск противозпилептических средств среди конкурентных антагонистов NMDA рецепторного комплекса весьма перспективен [Croucher et al., 1992]. Однако первые данные клинических испытаний конкурентных антагонистов (D-CPPene) оказались обескураживающими [Sveinbjornsdottir et al., 1993].

Испытания проводились на 8 больных, резистентных к традиционной антиэпилептической терапии. У большинства больных наблюдались выраженные побочные эффекты, включая атаксию, седацию, депрессию, амнезию и т.д. При этом выраженность побочных эффектов не коррелировала с уровнем препарата в крови. У четырех пациентов противосудорожный эффект препарата не проявился, а у трех судороги даже усилились. При этом концентрация препарата в сыворотке крови больных была выше, нежели можно было ожидать на основании данных фармакокинетики, полученных на здоровых добровольцах. Это, вероятно, связано с уже отмечавшимися выше сдвигом чувствительности и изменением числа рецепторов ВАР у больных эпилепсией [Emre, 1993].

Были сделаны попытки показать, что отрицательные клинические результаты связаны в первую очередь с отсутствием подходящих экспериментальных моделей для скрининга антиконвульсантов, которые были бы эффективны у пациентов, подверженных судорожным припадкам в течение длительного времени [Lowe et al., 1994]. Хотя, по данным других работ, такие побочные эффекты, как нарушения моторной активности, атаксия, мнестические нарушения, мышечная гипотония и др., свойственны всем антагонистам NMDA рецепторов [Cotterell et al., 1992; Loscher et al., 1993; Danysz et al., 1995].

МК-801 (дизоцилпин) - наиболее известный неконкурентный антагонист NMDA канального типа. Это соединение, а также другой неконкурентный антагонист NMDA - декстрометорфан - были испытаны в клинике как противоэпилептические препараты у больных с парциальной формой эпилепсии [Fisher et al., 1990b]. Дизоцилпин оказался неэффективным в дозах 0,01 - 0,03 мг/кг и лишь при пятикратном увеличении дозы полностью предотвращал развитие судорожного припадка. Наблюдаемые при этом выраженные поведенческие (нарушение координации, атаксия, психомоторное возбуждение) и нейрофизиологические (значительное увеличение мозгового кровотока и утилизации глюкозы, гипотермия) нарушения делают весьма сомнительной надежду на применение препаратов данной группы в клинике [Chapman, 1991; Baran H., et al., 1994]. Хотя имеются данные о том, что один из структурных аналогов дизоцилпина, ADCI (5-аминокарбонил - 10,11-дигидро-5Н-дибензоциклопентен-5,10-имин) также оказывал противосудорожное действие и имел значительно лучший по сравнению с дизоцилпином терапевтический индекс [Rogawski et al., 1991]. Поэтому предпринимаются попытки уменьшить выраженность побочных эффектов антагонистов NMDA рецепторов сочетанным применением других препаратов (см. ниже).

Выраженными противосудорожными свойствами обладает также применяемый уже в клинической практике низкоаффинный неконкурентный антагонист NMDA рецепторов канального типа мемантин (1-амино-3,5-диметиладамантан) [Fisher et al., 1990c; Nicoletti et al., 1996].

В настоящее время все большее внимание начинают привлекать лиганды глицин-связывающего сайта NMDA рецепторов [Chapman, 1991]. Отчетливую противосудорожную активность проявили антагонист 7-хлоркинуреновая кислота, слабый частичный агонист (+)-НА-966 и сильный частичный агонист D-циклосерин (D-CS) [Rundfeldt et al., 1994]. Показана высокая эффективность при системном введении D-CS против каинат-индуцированных судорог в сравнении с МК-801 и диазепамом на kindling модели эпилепсии [Baran et al., 1994]. Другой частичный агонист глицинового сайта L-687,414 [(R)-(+)-цис-β-метил-3-амино-1-гидроксипирролидин-2-он] блокировал судороги, вызванные NMDLA, коразолом и максимальным электрошоком, но был неэффективен на модели аудиогенных

Таблица 7.1 Потенциальные лекарственные средства, обладающие ВАКергической активностью.

2У Антагонисты полиаминового сайта

Соединение	Компания	Область применения	Фаза испытаний
------------	----------	--------------------	----------------

Конкурентные NMDA антагонисты

CGS-19755	Ciba-Geigy	Инсульт	II
CGP-37849	Ciba-Geigy	Эпилепсия	I
LY-235959	Eli Lilly	Нейродегенеративные расстройства	Доклинические
SDZ-EAA-494	Sandoz	Эпилепсия	I
MDL-100453	Marion Merrel Dow	Инсульт	Доклинические

Неконкурентные NMDA антагонисты

CNS-1102 CNS-1505	Cambridge Neurosc.	Инсульт	Доклинические
Memantine	Merz	Эпилепсия Инсульт	I
Remacemide	Fisons	Эпилепсия Инсульт	II
Dextromethorphan	Hoffman LaRoche	Инсульт	II

Антагонисты глицинового сайта

L-687414 L-689560	Merck	Эпилепсия Инсульт	Доклинические
ACPC	NIH	Эпилепсия	Доклинические
Felbamate	Carter Wallace	Эпилепсия	Регистрация

AMPA антагонисты

NBQX	Novo Nordisk Schering AG	Инсульт	I
------	-----------------------------	---------	---

Антагонисты полиаминового сайта

SL-820715	Synthelabo	Инсульт	II
-----------	------------	---------	----

судорог [Tricklebank et al., 1994]. Частичный агонист глицинового сайта АСРС также оказывает противосудорожное действие на модели NMDA индуцированных [Skolnick et al., 1989] и аудиогенных судорог у мышей линии DBA/2. Важно отметить, что АСРС почти в 8 раз увеличивает противосудорожную активность конкурентного NMDA антагониста CPPene [Meldrum, 1991b]. Из антагонистов глицинового сайта наиболее избирательным являются тиокинуреновая кислота и ее 7-хлорпроизводное [Lombardi et al., 1994; Smith, Meldrum, 1992].

Еще один антагонист глицинового сайта - фелбамат, обладает высокой противосудорожной активностью на экспериментальных моделях тонических (максимальный электрошок), клонических (коразоловый тест) и фокальных ("kindling") судорог, а также у людей при генерализованных и парциальных судорожных припадках [Wasterlain et al., 1992; Chronopoulos et al., 1993; Upton, 1994]. Кроме того, фелбамат является единственным на данный момент противоэпилептическим средством, эффективным в терапии синдрома Lennox-Gastaut (форма эпилепсии, считавшаяся ранее особенно устойчивой к лекарственной терапии) [Upton, 1994]. Однако, клиническое применение фелбамата возможно будет приостановлено из-за выраженных побочных эффектов.

Антагонисты неNMDA рецепторов. В первых работах, посвященных изучению механизма противосудорожного действия ВАКергических средств, основная роль в этом процессе отводилась рецепторам АМРА/каинатного типа [Chapman, 1991]. Селективные антагонисты этих типов рецепторов - производные хиноксалина NBQX и бензодиазепина GYKI 52466, эффективные при системном введении - обладают выраженной противосудорожной активностью. Их эффективность была показана на моделях АМРА-индуцированных судорог, аудиогенных судорог у мышей, а также индуцированных светом судорог у бабуинов рода Papio [Meldrum, Chapman, 1989]. ED₅₀ этих соединений находилась в пределах 15-30 мкмоль/кг при внутрибрюшинном введении с максимумом выраженности эффекта на 15-30 минуте исследования. По данным работы [Loscher et al., 1993] противосудорожное действие NBQX могут усиливать некоторые NMDA антагонисты. В целом следует отметить достаточно высокую эффективность соединений, обладающих неNMDA антагонистической активностью, что вселяет определенный оптимизм в отношении терапевтического потенциала данной группы соединений [Chapman, Meldrum, 1993].

Интересный факт был установлен при сочетанном введении неNMDA антагонистов и ноотропного средства анирацетама. Ранее было показано, что анирацетам потенцирует АМРА-вызванный ответ в ооцитах Xenopus, что связывается со снижением степени десенситизации АМРА/каинатных рецепторов [Vyklisky et al., 1991]. В работе Meldrum [1994] установлено, что предварительная (за 15 мин) внутрижелудочковая инъекция анирацетама в дозах 12,5 - 100 нмоль приводила к дозозависимому снижению антиконвульсантного действия GYKI 52466. Сам анирацетам не обладал проконвульсантной активностью. Действие вещества было специфично для АМРА/каинатных рецепторов и не влияло на выраженность эффекта CPPene. Механизм влияния анирацетама пока не ясен, однако предполагается участие в реализации его эффектов метаботропного рецептора ВАК.

Роль метаботропных рецепторов в процессах физиологической регуляции функционирования нейронов и развитии ряда патологических состояний изучена пока крайне плохо. С одной стороны, это объясняется гетерогенностью данной группы рецепторов и отсутствием специфических лигандов для каждого из них (см.

выше). С другой стороны, до последнего времени метаботропный рецептор рассматривается в основном как модулятор внутриклеточного метаболизма, а его вклад в развитие судорожного припадка остается в тени. В недавних исследованиях было показано наличие высокого проконвульсивного потенциала у агониста метаботропных рецепторов trans-ACPD при локальном введении в гиппокамп крысы [Schoerpp, 1994a]. Эффект этого соединения частично блокировался при введении антагониста метаботропного рецептора AP3. До настоящего времени не существует эффективных антагонистов метаботропного рецептора, однако можно предположить наличие отчетливых противосудорожных свойств у данной группы соединений как при изолированном, так и при сочетанном введении с антагонистами рецепторов AMPA/каинатного типа.

7.2. Противогипоксическое действие

В настоящее время накоплен обширный материал о проявлении антагонистами NMDA и неNMDA рецепторов церебропротекторных свойств. Однако широкое использование этих соединений в качестве антигипоксантов ограничено в первую очередь наличием большого числа побочных эффектов, о которых уже говорилось выше. Вместе с этим, даже имеющийся экспериментальный материал свидетельствует о высокой эффективности и перспективности разработки данной группы фармакологических средств. Следует отметить, что меньшая выраженность побочных эффектов у неNMDA антагонистов делает их более предпочтительными для использования в качестве противоишемических препаратов [Moudy, 1994; Meldrum, 1994].

На модели четырехсосудистой церебральной ишемии установлено, что профилактическое и лечебное введение антагониста AMPA рецептора - NBQX (3-30 мг/кг: внутрибрюшинно) вызывает дозозависимое снижение дистрофических изменений и предотвращает гибель нейронов в зоне CA1 гиппокампа восточной песчанки. Нейропротекторное действие вещества проявляется при введении даже спустя 2 часа после ишемического воздействия [Zhang, 1992].

Ранее было показано, что неконкурентные и конкурентные NMDA антагонисты: дизоцилпин, CPP, D-CPPene и др. также проявляют отчетливые нейропротекторные свойства, однако, их эффективность во многом объясняется гипотермией, наступающей при введении этих веществ и повышающей устойчивость мозга к гипоксии [Simon et al., 1985; Corbett et al., 1990; Minematsu, 1993]. В отличие от указанных соединений, NBQX не снижает температуру тела, что свидетельствует о более выраженном и избирательном церебропротекторном действии антагонистов AMPA рецепторов.

На модели ишемии мозга, вызванной 30-ти минутной перевязкой средней мозговой артерии (модель фокальной ишемии), с использованием неинвазивной методики оценки состояния нервной ткани модифицированным методом ЯМР показано наличие выраженных церебропротекторных свойств у неконкурентного показана наличие выраженных церебропротекторных свойств у неконкурентного антагониста NMDA рецепторного комплекса - соединения CNS 1102 [N-(1-нафтил)-N'-(3-этилфенил)-N'-метил-гуанидин гидрохлорид] [Bingman et al., 1989]. Это соединение, не влияя на большинство физиологических параметров организма (температура тела, артериальное давление и т.д.), приводило к снижению на 66% (температура тела, артериальное давление и т.д.), приводило к снижению на 66% зоны некроза в конвекситальной коре, гиппокампе и хвостом ядре, сопровождающемуся положительной динамикой развития неврологических расстройств. Эффект вещества наблюдался как при профилактическом, так и при лечебном введении в течение 5 (!) часов после начала ишемии. Неконкурентный антагонист NMDA - дизоцилпин также обладал на данной экспериментальной

модели терапевтической активностью, однако в значительно меньшей степени снижал зону некроза (23%) и не влиял на неврологические проявления ишемии.

В последнее время большое внимание уделяется изучению противогипоксических свойств неконкурентных антагонистов NMDA рецепторного комплекса - декстрометорфана и мемантина. Обладая отчетливой церебропротекторной активностью, указанные соединения не вызывают, подобно диэтилопиру и другим блокаторам ионного канала NMDA рецептора, характерных поведенческих и психотических расстройств и вполне могут использоваться в клинике в качестве эффективных средств при ишемиях мозга различного генеза [Kornhuber et al., 1994]. Перспективным может оказаться применение препаратов типа декстрометорфана у пациентов из группы риска по церебральной ишемии [Albers et al., 1991].

Наличие выраженных побочных эффектов у большинства селективных антагонистов ВАР, обладающих противоишемическим действием, является серьезным аргументом против их использования в клинике. Поэтому предлагается вести поиск эффективных церебропротекторных средств среди блокаторов выброса глутамата из пресинаптических терминалей [Graham et al., 1993]. Показано, что блокатор вератридин-индуцированного выброса глутамата соединение - BW1003C87 [5-(2,3,5-трихлорофенил)-2,4-диаминопиримидин] (аналог противоэпилептического средства - ламотригина) [Miller et al., 1986] как при профилактическом, так и при лечебном введении значительно снижает выброс глутаминовой кислоты в корковых и подкорковых структурах на модели фокальной и глобальной ишемии головного мозга. Аналогичные данные были получены при использовании ингибитора синтеза глутамата - метионинсульфоксимида на модели глобальной ишемии [Graham et al., 1993; Swanson et al., 1990].

Следует отметить, что в целом при поиске противоишемических препаратов в ряду ВАРгических соединений сложилась такая же ситуация, как и при поиске противосудорожных веществ - выраженность нежелательных побочных эффектов конкурентных и неконкурентных антагонистов рецепторов ВАР не позволяет рассчитывать на их клиническое применение. Решение этой проблемы лежит, возможно, в применении частичных агонистов [Sanger et al., 1991; Carlsson et al., 1989]. Можно рассчитывать, что эти соединения не будут обладать нейротоксическим действием, свойственным полным агонистам, а также побочными эффектами антагонистов, которые напрямую вытекают из блокады данного типа рецептора (например, мнестические нарушения при блокаде NMDA рецепторов и т.д.). При этом все большее внимание начинают привлекать частичные агонисты глицин-связывающего сайта NMDA рецепторно-ионофорного комплекса [Gill et al., 1995].

7.3. Нейродегенеративные расстройства

Болезнь Альцгеймера. В предыдущих главах книги подробно рассмотрен вопрос участия ВАРгических нейронов в физиологической регуляции мнестических и когнитивных функций, показана ключевая роль рецепторов ВАР в механизмах развития длительной потенциации нейрона - нейрофизиологического эквивалента памяти. В этой связи становится понятной актуальность и перспективность поиска эффективных фармакологических средств, оказывающих позитивное влияние на расстройства памяти, наблюдаемые в клинике, среди химических соединений, обладающих ВАРгической активностью. Больше всего публикаций по данной проблеме посвящено исследованию механизма развития и путей фармаколо-

гической коррекции мнестических расстройств при сенильной деменции типа болезни Альцгеймера [Swintosky, Mattson, 1994; Patel, 1995].

Б-нь Альцгеймера (БА) - наиболее распространенный вариант старческой деменции, характеризующийся прогрессирующими нарушениями памяти и когнитивных функций мозга и сопровождающийся специфическими характерологическими изменениями личности. В настоящее время только в США зарегистрировано около 1,5 млн. больных БА. Считается, что более 70 % людей старческого возраста в той или иной степени страдают данной патологией [Leblhuber, 1994]. Это заболевание является, вероятно, одной из форм общего процесса старческой дистрофии нервной ткани, сопровождающееся прогрессирующей дегенерацией нейронов. Однако, это не исключает необходимости поиска путей коррекции заболевания и изучения механизма его развития.

Глутаматергическая гипотеза развития деменции при болезни Альцгеймера впервые была выдвинута в 1988 году [Greenamyre et al., 1988]. Ассоциативные глутаматергические связи в коре головного мозга нарушены при болезни Альцгеймера, причем выраженность этих нарушений коррелирует с клиническими проявлениями болезни [Greenamyre et al., 1988; Braak et al., 1993; Francis et al., 1993]. Поэтому было предположено, что использование позитивных модуляторов рецепторов ВАР может давать симптоматическое улучшение клинической картины [Bowen et al., 1992; Danysz et al., 1994].

Результаты биопсии, а также посмертные морфологические исследования препаратов мозга больных, страдавших БА, свидетельствуют о наличии выраженных атрофических изменений в областях, напрямую связанных с процессами фиксации новой информации, а также высшими интегративными функциями мозга (гиппокамп, новая кора, некоторые базальные ядра). Показано, что в наибольшей степени подвержены дистрофии базальные ядра Мейнерта, содержащие холинергические нейроны, проецирующиеся в гиппокампальные структуры. Экспериментальные [Garthwaite et al., 1991] и клинические [Greenamyre et al., 1987] данные свидетельствуют о важной роли холинергических проекций этой структуры в гиппокамп и другие зоны мозга в процессах пространственной ориентации, обработке поступающей информации и фиксации энграмм. Аналогичные дистрофические изменения установлены в гиппокампе, субикулуме, различных зонах конвекситальной коры [Leonard et al., 1993]. Наличие в зонах атрофии характерных для данной патологии амилоидных бляшек натолкнуло исследователей на мысль о возможной генетической природе заболевания [Swintosky, Mattson, 1994]. Согласно современным представлениям ключевым звеном патогенеза БА является нарушение метаболизма β -амилоидного пептида нервной ткани, вызванного генетическими мутациями соответствующих локусов 21, 19, и 14 хромосом. Причины мутаций могут быть различны, однако наиболее значимая из них, являющаяся основным фактором риска заболевания - это возраст больного. Накопление дефектных субъединиц белка-мономера приводит к его быстрой полимеризации и деструкции нейрона и сомы и заканчивается гибелью нейрона. Своеобразным катализатором процесса является лавинообразное накопление в цитоплазме свободного кальция, запускающего каскадный механизм каталитических ферментативных реакций [Berger et al., 1995]. Дело в том, что полноценный амилоидный пептид-мономер принимает активное участие в регуляции поступления кальция извне и из внутриклеточных депо, выступая одновременно в качестве белкового буфера. До настоящего времени не известно путей восстановления поврежденных локусов хромосом, поэтому наиболее

вероятным и эффективным способом борьбы с атрофией нейрона является блокада кальций-зависимых ферментативных реакций в клетке.

Ранее обсуждался вопрос о роли ионов кальция в процессе медиаторной ВАКергической передачи. В последнее время получены данные о важной роли неконтролируемого выброса ВАК в патогенезе БА [Madsen et al., 1994]. Установлено, что именно ВАК-чувствительные нейроны подвергаются атрофии раньше, чем любые другие. Этот процесс, очевидно, идет по описанному выше механизму "excitotoxicity". Логично предположить, что использование блокаторов ВАКергической нейротрансмиссии способно в значительной степени затормозить патологический процесс, а такие препараты могут быть использованы для патогенетической терапии заболевания.

В последнее время предпринимаются попытки использования для коррекции мнестических расстройств при БА различных групп антагонистов рецепторов ВАК [Gottfries, 1994]. Однако при оценке терапевтического потенциала препаратов следует учитывать одно важное обстоятельство, весьма осложняющее их применение. Действительно, фармакологическое вмешательство, приводящее к полной или частичной блокаде рецепторов ВАК, будет усиливать мнестические расстройства, наблюдаемые при БА, в то время как попытка улучшения мнестических функций неизменно будет потенцировать нейротоксичность, являющуюся основным патогенетическим фактором этого заболевания. Одним из возможных терапевтических подходов можно считать использование в будущем у больных БА частичных агонистов рецепторов ВАК, а также пресинаптических блокаторов выброса медиатора [Madsen et al., 1994].

Примером реализации подобной стратегии можно считать применение у больных БА частичного агониста глицинового сайта NMDA рецепторов D-циclosерина, описанное в работе [Randolph et al. 1994]. Лишь незначительное улучшение было засвидетельствовано после применения D-циclosерина [Randolph et al. 1994], но не прекурсора глицина милацемида [Waziri, 1988; Campbruno, Herting, 1994]. Одним из наиболее существенных недостатков терапии D-циclosерином оказалось постепенное развитие толерантности к антимнестическому действию [Randolph et al. 1994]. Недавно опубликованы результаты, свидетельствующие об эффективности использования упоминавшегося выше BW1003C87 для коррекции мнестических расстройств при БА [Patel, 1995].

Альтернативным направлением поиска лекарств, повышающих когнитивные функции, является поиск соединений, замедляющих десенситизацию AMPA рецепторов. Известно, что ряд классических ноотропных средств (например, анирацетам) способны облегчать долговременную потенциацию вследствие влияния на процессы десенситизации AMPA рецепторов [Staubli et al., 1992]. Экспериментальные и клинические исследования показали улучшение процессов обучения у животных и умеренный клинический эффект при болезни Альцгеймера [Lee, Benfield, 1994]. Десенситизация AMPA рецепторов замедляется также при введении диуретика циклотиазида и его аналогов [Yamada, Tang, 1993]. Один из этих аналогов IDRA 21 показал наибольшую эффективность в электрофизиологических и *in vivo* экспериментах и проходит расширенные преклинические испытания [Zivkovic et al., 1995]. IDRA 21 не обладает нейротоксическим действием при инкубации на клеточной культуре [Zivkovic et al., 1995], но потенцирует токсический эффект AMPA [Moudy et al., 1994].

Значительный интерес вызывает также и другой класс позитивных аллостерических модуляторов AMPA рецепторов - AMPАкины (ВА-14 и ВА-74) [Arai et al., 1994]. О механизме их действия известно лишь то, что они повышают связывание меченой AMPA [Arai et al., 1994]. Многочисленные данные

свидетельствуют о способности АМРАкинов усиливать долговременную потенцию и синаптическую передачу в гиппокампе [Coogan et al., 1994; Staubli et al., 1994a], улучшают обучение в различных экспериментальных моделях [Granger et al., 1993; Rogan et al., 1994; Shors et al., 1994; Staubli et al., 1994b]. АМРАкины находятся в первой фазе клинических испытаний [Danysz et al., 1995].

Позитивная модуляция АМРА рецепторов, очевидно, повышает способность глутамата деполяризовать нейроны-мишени и, следовательно, повышает вероятность снятия магниевого блока канала NMDA рецепторов, что, в свою очередь, усиливает долговременную потенцию и облегчает процессы обучения. С другой стороны, вещества, замедляющие десенситизацию АМРА рецепторов, скорее всего способствуют активации всего пула АМРА рецепторов, что может сказаться на большем количестве побочных эффектов.

Паркинсонизм - это клинический синдром, характеризующийся брадикинезией, мышечной ригидностью, тремором, и нарушениями походки. Первичным патогенетическим механизмом развития болезни Паркинсона является гибель 80-90% нейронов черной субстанции (pars compacta), дающих дофаминергические проекции в полосатое тело, хвостатое ядро и оgradu. При этом предполагается, что нейродегенеративные изменения запускаются по уже описанному механизму "excitotoxicity". Гипотеза о возможном терапевтическом потенциале антагонистов NMDA рецепторов основывается на экспериментальных данных, полученных на обезьянах, которым вводили селективный дофаминергический токсин MPTP (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин). Помимо характерных для паркинсонизма поведенческих изменений у этих животных наблюдали повышенную нейрональную активность в черной субстанции, бледном шаре (внутренние сегменты) и субталамических ядрах, которая блокировалась при введении антагонистов NMDA рецепторов [Klockgether, Turski, 1989, 1990]. Антагонисты NMDA рецепторов предотвращают также избирательное в отношении дофаминергических нейронов токсическое действие метаболита MPTP 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP^+) у крыс и метамфетамина у мышей [Turski et al., 1990b]. Кроме того, у животных (крысы, мыши) с истощенными нейрональными запасами дофамина (посредством резерпина и α -метилпаратирозина), введение конкурентных и неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов усиливает способность дофаминопозитивных средств (L-ДОПА, апоморфин) устранять паркинсоноподобную симптоматику, т.е. мышечную ригидность и акинезию [Carlsson, Carlsson, 1991; Klockgether, Turski, 1990]. Различные антагонисты NMDA рецепторов (в частности, декстрометорфан) проходят в настоящее время клиническую апробацию [Bonucelli et al., 1992; Saenz et al., 1993].

Как уже отмечалось выше (см. главу 4), существует большое количество экспериментальных данных о взаимодействии ВАКергической и дофаминергической систем в базальных ядрах мозга. Добавим лишь, что активация постсинаптических NMDA и D1-дофаминовых рецепторов приводит к противоположным изменениям в уровне цАМФ-зависимого фосфорилирования белка DARPP-32 [Halpain et al., 1990], указывая на возможность наличия у антагонистов NMDA рецепторов косвенных дофаминопозитивных свойств на клеточном уровне. Системное введение ряда антагонистов рецепторов ВАК, как и дофаминопозитивных веществ, характеризуется стимуляцией локомоторной активности у резерпинизированных животных [Starr, Starr, 1993]. Однако, у животных с неизменной дофаминергической функцией психомоторная

стимуляция является более характерным для действия неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов, так как в отличие от последних, конкурентные антагонисты NMDA рецепторов не усиливают метаболизм дофамина в базальных ядрах, значительно меньше или совсем не стимулируют локомоторную активность при введении интактным животным и уменьшают локомоторные стимулирующие свойства и аддиктивный потенциал наркотиков психостимулирующего типа действия [Pulvirenti et al., 1989, 1991, 1992; Rao et al., 1990; Svensson et al., 1991; Bubser et al., 1992; Loscher, Honack, 1992; Murata, Kawasaki, 1993].

Согласно выдвинутой недавно гипотезе [Di Chiara, Morelli, 1993], в основе антипаркинсонической активности антагонистов NMDA рецепторов может лежать уменьшение D₁-зависимого высвобождения ацетилхолина в полосатом теле. Известно, что холинергические нейроны полосатого тела находятся под тоническим возбуждающим контролем глутаматергических проекций из коры головного мозга [Consolo et al., 1990]. Предполагается, что усиление дофаминзависимого высвобождения ацетилхолина в полосатом теле при паркинсонизме происходит за счет дисбаланса тормозных и возбуждающих влияний на ГАМКергические нейроны полосатого тела, которые находятся под тоническим воздействием дофаминергических проекций из черной субстанции (отсутствуют при паркинсонизме!), глутаматергических проекций из коры и холинергических проекций, локализованных в пределах полосатого тела. Активация ГАМКергических нейронов через черную субстанцию (pars reticulata) и таламус опосредованно стимулирует глутаматергические нейроны коры головного мозга, одним из следствий чего является усиление возбуждающих проекций на холинергические нейроны полосатого тела. Поэтому, по аналогии с м-холиноблокаторами, антагонисты NMDA рецепторов оказывают косвенное холинонегативное действие (предотвращают синаптическое высвобождение ацетилхолина) [Damsma et al., 1990] и обладают антипаркинсоническими свойствами.

Хорея Гентингтона - нейродегенеративное расстройство, наследуемое по аутосомно-доминантному принципу и выражающееся постепенным развитием моторных и когнитивных расстройств. Первыми проявлениями болезни являются затруднения при выполнении точных движений и нарушения глазных движений, к которым впоследствии присоединяются короткие непроизвольные подергивания конечностей, туловища, лица и шеи (хорея). Развитие заболевания связывают с гибелью нейронов в хвостатом теле и острого. Этиопатогенез хореи Гентингтона до конца не выяснен, однако экспериментальные данные указывают на возможную роль ВАКергической передачи. Так, например, введение агониста NMDA рецепторов хинолиновой кислоты в полосатое тело крыс приводит к изменениям, напоминающим хорею Гентингтона [Beal et al., 1986]. Более того, антагонисты NMDA рецепторов способны предотвращать гибель нейронов в экспериментальных моделях хореи Гентингтона [Beal et al., 1992].

Боковой амиотрофический склероз - пример еще одного нейродегенеративного заболевания, возникновение которого связывают с избыточной стимуляцией рецепторов ВАК. При этом заболевании наблюдается уменьшение массы нейронов вентральных рогов спинного мозга и кортикальных нейронов, отдающих афферентные проекции в нейроны вентральных рогов. Клиническая картина включает быстро прогрессирующие мышечную слабость, атрофию, фасцикуляции, спастичность, дизартрию, дисфагию и респираторные расстройства. Сенсорные,

когнитивные, вегетативные и окуломоторные функции обычно не страдают. Повышенная концентрация глутамата в спинномозговой жидкости [Rothstein et al., 1992] послужила основанием для проведения ряда пока что неудачных клинических испытаний антагонистов рецепторов ВАР (декстрометорфан, ламотригин) у больных боковым амиотрофическим склерозом [Testa et al., 1989; Askmark et al., 1993; Eisen et al., 1993]. Однако, рецепторы ВАР по-прежнему остаются потенциальными мишенями в терапии этого заболевания. Блокатор синаптического высвобождения глутамата рилузол отдала наступление летального исхода и необходимость в трахеостомии у больных с бульбарной, но не спинальной формой бокового амиотрофического склероза [Bensimon et al., 1994].

СПИД. Остановимся еще на одном заболевании, в процессе которого происходит гибель нейронов и при которой возможна терапия ВАКергическими соединениями. Речь идет о возможности использования антагонистов NMDA рецепторов для лечения нейрональных поражений у больных СПИДом. До 50% этих больных страдают от различных неврологических расстройств, включающих в себя когнитивные и моторные расстройства. Установлено, что причиной этого является гибель нейронов в мозге в результате возрастания внутриклеточной концентрации ионов кальция под действием оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1 [Lipton et al., 1991]. Оказалось, что этот белок избирательно ингибирует рецепторы ВАР NMDA типа. Это показано, в частности, в исследованиях по ингибированию им связывания меченых лигандов с NMDA рецептором. Белок gp120 ингибирует также NMDA-индуцированные токи в ооцитах *Xenopus*, влияет на NMDA-стимулированный кальциевый ток и цитотоксичность в культуре клеток. В опытах *in vivo* белок gp120 обеспечивает частичную защиту от действия NMDA [Sweetnam, 1993]. Было показано также, что ВИЧ-инфицированные моноциты вырабатывают фактор некроза опухоли (TNF alpha), который оказывает нейротоксическое действие на нейроны коры, причем это действие усиливается в присутствии AMPA и блокируется антагонистом AMPA рецепторов CNQX [Gelbard et al., 1993]. Следовательно, антагонисты различных типов рецепторов ВАР могут применяться для предотвращения и лечения нейрональных поражений у больных СПИД. Подробно эта проблема рассмотрена в работах [Lipton, 1994a, 1994b; Lubetzki, 1995].

7.4. Анальгетическое действие

Как уже указывалось выше, существует много доказательств того, что рецепторы ВАР опосредуют ответ на термическую, механическую, химическую (формалин), а также ишемическую болевые стимуляции [Sher, Mitchell, 1990; Dougherty, Willis, 1991]. Поэтому не удивительно, что среди ВАКергических соединений могут существовать вещества с выраженным терапевтическим анальгетическим потенциалом. Сравнительному исследованию анальгетической активности лигандов различных сайтов NMDA рецепторно-ионофорного комплекса в различных тестах было посвящено большое количество работ [см., например, Nasstrom et al., 1992].

Наиболее адекватным методом изучения анальгетических свойств антагонистов рецепторов ВАР является сравнительный анализ их эффектов на моделях, оценивающих болевое восприятие и сохранность моторных функций. Этому вопросу было посвящено детальное исследование Coderre и van Empel [1994a], в котором антагонисты различных типов рецепторов ВАР вводились в субарахноидальное пространство крыс. В больших дозах МК-801 и 7-хлоркинуреновая кислота уменьшали реагирование на механическое и

термическое болевое воздействие, в то время как СРР был эффективен лишь на модели термической боли. Парадоксальный гипералгетический эффект наблюдался после введения полиаминового антагониста аркаина и глицинового антагониста 5-фториндол-2-уксусной кислоты. В формалиновом тесте (болевое поведение после введения формалина в плантарную поверхность задней лапы) активностью обладали только МК-801 и AP-7. Никаких изменений порогов болевой чувствительности не было обнаружено после введения CNQX, ифенпродила и 1-AP3. В целом по данным этих авторов изменение порогов болевой чувствительности сопровождалось выраженными расстройствами моторной координации, которые в силу относительной неспецифичности ноцицептивных моделей могли имитировать изменения в болевом восприятии. Однако, это заключение не исключает принципиальной возможности существования антагонистов рецепторов ВАР с истинным аналгетическим потенциалом. Например, частичный агонист глициновых рецепторов (+)-НА-966 обладает собственным аналгетическим эффектом, не связанным с седативными, миорелаксирующими или моторными свойствами этого вещества [Sequin, Millan, 1994].

Комплексный характер функционирования NMDA рецептора указывает на возможность комбинированного применения двух и более лигандов этого рецепторного комплекса. Coderre и van Empel [1994b] показали, что антиноцицептивная активность AP-7 и МК-801 потенцируется при сочетанном интратекальном введении с глицином и агонистом полиаминового сайта спермином, соответственно, в то время как антагонисты глицинового (7-хлор-кинуреновая кислота) и полиаминового (ифенпродил) сайтов оказывали противоположное действие. Описываемые изменения в аналгетической активности AP-7 и МК-801 не сопровождались моторными расстройствами.

Еще интересным подходом к использованию антагонистов рецепторов ВАР в терапии болевых синдромов является применение этих веществ в комбинации с аналгетиками, представляющими другие фармакологические группы. Например, было показано, что аналгетический эффект морфина при субарахноидальном введении потенцируется сочетанным введением антагонистов рецепторов ВАР [Charman and Dichenson, 1992b]. Кроме того, клинические испытания показали способность субанестетических доз кетамин значительно повышать аналгетический потенциал морфина у резистентных к последнему онкологических больных [Sosnowski, 1993]. С другой стороны, частичный агонист глициновых сайтов (+)-НА-966 потенцирует аналгетический эффект антагонистов тахикининовых NK₁ рецепторов [Sequin and Millan, 1994].

Одним из наиболее перспективных направлений является применения антагонистов NMDA рецепторов при нейропатическом (нейрогенном) болевом синдроме. Несмотря на многообразие этиологических факторов и топографической локализации, нейропатический болевой синдром в целом имеет общие клинические характеристики: болевые ощущения в области сенсорного дефицита, пароксизмы "стреляющей" боли, неприятные ощущения "жгущего" и/или "электрического" характера, аллодиния или гипералгезия и др. [Bennett, 1994a]. Общность клинических проявлений указывает на наличие единого патофизиологического процесса. Основной чертой экспериментального нейропатического болевого синдрома считается повышенная возбудимость нейронов задних рогов спинного мозга, у которых повреждены или отсутствуют нормальные афферентные связи. Повышенная возбудимость этих нейронов проявляется в снижении порогов вызванной активности, расширением зон различных видов чувствительности (например, на кожных покровах), а также в способности неболевых стимулов

вызывать реакции, наблюдаемые обычно при раздражении С-волокон [Bennett, 1994a,b].

Большое количество экспериментальных и клинических данных свидетельствует о ключевой роли NMDA рецепторов в патогенезе этого болевого синдрома [Dickenson, Sullivan, 1987; Davies, Lodge, 1987; Dickenson, 1990; Coderre et al., 1993; Felsby et al., 1996]. Например, антагонисты NMDA рецепторов (AP5 и кетамин) подавляют запуск так называемого феномена "wind-up", проявляющегося в долговременном увеличении возбудимости нейронов задних рогов с каждым последующим раздражением С-волокон электрическим током с частотой более 0.3-0.5 Гц [Dickenson, Sullivan, 1987; Davies, Lodge, 1987]. Гиперчувствительность к тактильным и термическим раздражителям (гипералгезия) при экспериментальном нейропатическом болевом синдроме также блокируется введением различных антагонистов NMDA рецепторов, включая применяемые уже в клинике препараты декстрометорфан и мемантин [Ren et al., 1992a; Sher et al., 1992; Yamamoto and Yaksh, 1992b; Eisenberg et al., 1993; Mao et al., 1993; Bennett, 1994b].

У людей болевой синдром, обусловленный временной суммацией вторичных болевых ощущений, рассматривается как своего рода аналог феномена "wind-up" и эффективно купируется при введении кетамина [Felsby et al., 1996] и декстрометорфана [Price et al., 1994]. Системное введение кетамина в субанестетических дозах также блокирует проявления "фантомного" болевого синдрома [Stannard, Porter, 1993], хронической пост-герпетической невралгии [Eide et al., 1994], пост-ишемических и других нейропатических болевых состояний у людей [Byas-Smith, 1993; Park et al., 1993; Öye et al., 1993; Backonja et al., 1994]. Описан также случай излечения нейрогенного болевого синдрома после субарахноидального введения конкурентного антагониста NMDA рецепторов CPP [Kristensen et al., 1992].

Весьма ограниченные данные свидетельствуют о том, что активация неNMDA рецепторов ВАК также задействована в патогенезе экспериментального болевого синдрома нейрогенного [Mao et al., 1992] и воспалительного [Mao et al., 1994] характера. Еще меньше известно об участии метаботропных рецепторов в механизмах возникновения гипералгезии [Meller et al., 1993; Mao et al., 1995].

7.5. Анксиолитические свойства

Даже поверхностное сравнение эффектов активации тормозных медиаторных систем и угнетения возбуждающей передачи приводит к предположению о возможности общих проявлений на организменном уровне. И, действительно, экспериментальные данные свидетельствуют, что стимуляция ГАМК-рецепторного комплекса (например, агонистами ГАМК рецепторов, пентобарбиталом, бензодиазепинами) ведет к изменениям в поведении (нарушение двигательной активности и моторной координации, противосудорожное действие), наблюдаемым также при введении антагонистов NMDA рецепторов [Willettts et al., 1990]. Еще в середине 80-х годов была высказана гипотеза о бензодиазепиноподобном анксиолитическом действии NMDA антагонистов [Bennett, Amrick, 1987]. Ниже мы приводим данные, говорящие, как против, так и в пользу этой гипотезы.

Экспериментальные модели. "Конфликтные" методики [см., например, Cook, Davidson, 1973] основаны на использовании инструментального (оперантного) поведения как объекта действия исследуемых веществ. Несмотря на обилие методических подходов, можно выделить несколько объединяющих их черт. Субъекты эксперимента имеют ограниченный доступ к первичным подкрепляющим агентам (вода, пища) и для того, чтобы получить доступ к воде или пище во время

эксперимента должны произвести требуемую инструментальную (оперантную) реакцию (например, нажать на педаль). Типичная методика имеет два компонента: "ненаказуемый" (инструментальная реакция подкрепление) и "наказуемый" (инструментальная реакция подкрепление одновременно с умеренной электрической болевой стимуляцией). Общая частота инструментальной реакции во время "наказуемого" ("конфликтного") компонента обычно ниже, чем во время "ненаказуемого" компонента. Введение анксиолитических средств в дозах, не изменяющих поведения в "ненаказуемые" отрезки эксперимента, довольно селективно повышает частоту инструментальной реакции во время "наказуемого" компонента.

Широко используются также и "неконфликтные" методики: "крестообразный лабиринт" [Pellow, File, 1986], тест парного взаимодействия [File, 1980], тест "четырех площадок" [Bossier et al., 1968], а также ультразвуковая вокализация у изолированных крысят [Gardner, 1985]. Применение "крестообразного лабиринта" основано на том, что крысы или мыши, помещенные в незнакомую обстановку (лабиринт), проводят большую часть теста в "закрытых" рукавах лабиринта. В тесте парного взаимодействия исследуется поведение животного ("интродера") на территории незнакомого "резидента". Усиление "социальной" активности "интродера" без сопутствующих изменений общей двигательной активности рассматривается как анксиолитический эффект. В тесте "четырех площадок" переход субъекта с одной площадки на другую приводит к электроболевному раздражению. Анксиолитическое действие исследуемых веществ выражается в более частом пересечении линий, разделяющих экспериментальную арену на четыре равных по площади квадрата.

Существенная информация о наличии и фармакологических особенностях анксиолитического действия веществ может быть получена с помощью изучения их дискриминативных стимульных свойств [Balster, 1990]. Для этого животных обучают выполнению определенной инструментальной реакции после инъекции таких веществ, как пентобарбитал или диазепам (например, нажатие на одну из двух педалей, одновременно присутствующих в стандартной камере Скиннера), и качественно отличной реакции после введения растворителя (например, нажатие на другую педаль). Характер инструментальной реакции после введения исследуемых веществ (например, NMDA антагонистов) указывает насколько дискриминативные стимульные свойства тестируемых соединений близки к таковым у веществ, использованных при обучении. Однако, следует отметить, что данные подобных экспериментов следует интерпретировать с особой осторожностью ввиду того, что стимульные свойства - это целый комплекс субъективных ощущений, вызываемых введением вещества, и анксиолитическое действие (точнее говоря, то, что является его субъективным аналогом) выступает лишь в роли составляющей. В другой разновидности описываемой методики исследуется способность исследуемых веществ антагонизировать дискриминативным стимульным свойствам классических анксиогенов (например, пентилентетразола).

Конкурентные NMDA антагонисты. Анксиолитические свойства NMDA антагонистов были продемонстрированы на мышах, крысах, голубях с применением различных моделей (см. таблицу 7.2) [Wiley, Balster, 1993]. На "конфликтных" моделях все исследованные к настоящему времени конкурентные NMDA антагонисты избирательно увеличивали "наказуемое", но не "ненаказуемое" поведение [Bennett, Amrick, 1986, 1987; Bennett et al., 1989; Wiley et al., 1990; Koek, Colpaert, 1991]. В целом, по выраженности "антиконфликтного" действия эти вещества уступали бензодиазепинам [Wiley et al., 1992b, см. однако

Bennett et al., 1989]. Определенное клиническое значение может иметь тот факт, что при повторном введении этих веществ не наблюдается толерантности к "антинаказующему" действию [Wiley et al., 1992; Willetts et al., 1993].

Конкурентные NMDA антагонисты увеличивают также время пребывания в "открытых" рукавах "крестообразного лабиринта" [Stephens et al., 1986; Dunn et al., 1989; Guimaraes et al., 1991; Wiley et al., 1995], усиливают социальное взаимодействие в тесте "интродер-резидент" [Dunn et al., 1989], повышают частоту наказуемых переходов в тесте "четырёх площадок" [Stephens et al., 1986; Stephens, Andrews, 1988] и уменьшают ультразвуковую вокализацию у крысят, изолированных от крыс-матерей [Winslow et al., 1990; Kehne et al., 1991].

Низкая активность некоторых антагонистов (AP5, AP7) в значительной мере определяется недостаточным проникновением через гематоэнцефалический барьер [Chapman et al., 1983]; конформационно более жесткие аналоги AP5 и AP7 (CGS 19755 и CPP, соответственно) характеризуются более высокой активностью, сравнимой с действием диазепама [Bennett et al., 1989]. Введение AP7 в дорсальную часть околотоводопроводного серого вещества уменьшает анксиогенные свойства "открытых" рукавов крестообразного лабиринта, указывая на эту область мозга как возможного медиатора анксиолитического действия NMDA антагонистов [Guimaraes et al., 1991]. Другим фармакокинетическим фактором, влияющим на анксиолитическую активность NMDA антагонистов является путь введения веществ. Так, CGS 19755 обладал "антиконфликтным" действием после внутрибрюшинного, но не перорального введения [Bennett et al., 1990]. Стереоселективность эффектов конкурентных NMDA антагонистов была целью исследования лишь в одном сообщении, продемонстрировавшем более высокую активность D-изомера AP7 по сравнению с рацематом в тесте "четырёх площадок" [Stephens, Andrews, 1988]. Сравнительное изучение "антиконфликтного" действия конкурентных NMDA антагонистов показывает, что активность соединений коррелирует со сродством к NMDA рецептору [Lehmann et al., 1988; Willetts, Balster, 1989a; Koek, Colpaert, 1991].

Однако изучение дискриминативных стимульных свойств конкурентных NMDA антагонистов, к сожалению, не дало однозначных свидетельств о наличии анксиолитической активности у этого класса соединений. В отличие от бензодиазепинов, конкурентные NMDA антагонисты не блокируют стимульные свойства таких анксиогенов, как пентилентетразола и этилового эфира β -карболина [Stephens et al., 1986; Liebman, Bennett, 1988; Woods et al., 1988]. Более того, у крыс, различающих стимульные свойства диазепама или анксиоселективного соединения CGS 9896 от растворителя, конкурентные NMDA антагонисты не вызывали диазепам- или CGS 9896-подобного поведения в дозах, не вызывающих значительных изменений в поведении [Bennett, Amrick, 1986; Liebman, Bennett, 1988]. С другой стороны, существуют данные о наличии у конкурентных NMDA антагонистов NPC 12626 и CPP пентобарбиталоподобных стимульных свойств [Willetts, Balster, 1989b; Willetts et al., 1991].

Несмотря на то, что преобладающее количество исследователей сообщают о наличии анксиолитического действия конкурентных NMDA антагонистов у грызунов и голубей, этот эффект не был обнаружен при исследовании CPP и NPC 12626 на беличьих обезьянах [Mansbach et al. 1991]. Следует отметить, что подобная видоспецифичность анксиолитического действия ранее наблюдалась для буспирона [McCloskey et al., 1987].

Неконкурентные NMDA антагонисты. Несмотря на интенсивное изучение влияния неконкурентных ("канальных") NMDA антагонистов на "наказуемое" поведение, накопленные данные довольно противоречивы (табл. 7.2). Методологических особенностей [McMillan, 1975] и различного экспериментального опыта субъектов [Glowa, Barrett, 1983] едва ли достаточно, чтобы прояснить ситуацию. Например, согласно одному из сообщений, фармакологически очень близкие вещества фенциклидин (PCP) и МК-801 по-разному влияли на "наказуемое" поведение на одной и той же экспериментальной модели [Sanger, Jackson, 1989].

Известно, что многие неконкурентные NMDA антагонисты имеют сродство и к другим типам рецепторов [Lodge, Johnson, 1990] и таким образом, возможно, маскируют "антиконфликтное" действие, опосредованное NMDA рецепторами. Существенную роль играют также фармакокинетические факторы. Например, было показано, что МК-801 увеличивает "наказуемое" поведение у крыс при введении за 2 и более часа перед тестированием, но не раньше (Clineschmidt et al., 1982; см. однако Sanger, Jackson, 1989; Kuribara et al., 1990).

За небольшим исключением [Chait et al., 1981; Porter et al., 1989], большинство данных свидетельствует о том, что неконкурентные NMDA антагонисты уступают бензодиазепинам и барбитуратам по силе "антиконфликтного" действия [Sanger, Jackson, 1989; Wenger, 1980]. Увеличение "наказуемого" поведения под влиянием неконкурентных NMDA антагонистов коррелирует с их сродством к фенциклидиновому месту связывания в канале NMDA-рецепторного комплекса, а также с их способностью вызывать фенциклидиноподобные дискриминативные стимульные эффекты [Porter et al., 1989; McMillan et al., 1991].

Подобно конкурентным антагонистам, неконкурентные антагонисты не обладали активностью на "конфликтных" моделях у беличьих обезьян [Clineschmidt et al., 1982; Goldberg et al., 1983; Mansbach et al., 1991].

Единственный представитель этого подкласса NMDA антагонистов, действие которого изучалось также на "неконфликтных" моделях, - МК-801 (дизоцилпин). Анксиолитическая активность была обнаружена в тестах парного взаимодействия [Dunn et al., 1989], ультразвуковой вокализации изолированных крысят [Winslow et al., 1990; Kehne et al., 1991], "крестообразном лабиринте" [Dunn et al., 1989], но не в тесте "четырёх площадок" [Stephens, Andrews, 1988].

Другие лиганды рецепторов ВАР. NMDA не обладает активностью на "неконфликтных" моделях [Dunn et al., 1989; Winslow et al., 1990]. В то же время, дискриминативные стимульные свойства этого вещества имеют много общего с таковыми у ряда классических анксиогенов [Woods et al., 1988; Grech et al., 1993], что еще раз подчеркивает возможное участие NMDA-рецепторного комплекса в анксиогенезе.

Антагонисты (производные кинуреновой кислоты, АСЕА 1021, НА 966) и частичные агонисты (АСРС), действующие на глициновый сайт, обладают активностью на "неконфликтных" моделях у грызунов [Trullas et al., 1989; Winslow et al., 1990; Kehne et al., 1991; Wiley et al., 1995], однако мало эффективны при использовании "конфликтных" методик у голубей [Koek, Colpaert, 1991].

Аналогичные результаты получены при исследовании ифенпродила, антагониста полиаминового сайта в NMDA-рецепторном комплексе. Ифенпродил не изменял "наказуемого" поведения крыс и голубей [Sanger, Jackson, 1989; Koek, Colpaert, 1991], но уменьшал ультразвуковую вокализацию изолированных крысят [Winslow et al., 1990].

Данные об анксиолитическом действии антагонистов неNMDA рецепторов и неселективных антагонистов рецепторов ВАР весьма ограничены. Антагонисты АМРА рецепторов NBQX и LY 326325 обладали анксиогенным действием в крестообразном лабиринте у мышей [Karcz-Kubicha, Liljequist, 1995], в то время как LY 215490 усиливал "наказуемое" поведение у голубей [Benvenista et al., 1993]. У неселективного глутаматного антагониста рилузола не было обнаружено антиконфликтных свойств в экспериментах на крысах и голубях [Stutzmann et al., 1989; Koek, Colpaert, 1991]. Метаболический предшественник кинуреновой кислоты индол-3-пировиноградная кислота при системном введении обладала анксиолитическим действием в крестообразном лабиринте [Lapin, Politi, 1993] (табл. 7.2).

Таблица 7.2 Сравнительная оценка анксиолитической активности лигандов NMDA рецепторов

Наличие анксиолитической активности	Конкурентные NMDA антагонисты	Неконкурентные NMDA антагонисты	Лиганды глицинового участка	Другие вещества
Есть	CGS 19755 AP7 NPC 12626 NPC 17742 CPP AP5 MDL 100,453	PCP TCP Кетамин МК-801 SKF 10,047 Циклазопин Этоксадрол	ACPC 7-хлоркинуреновая кислота 5,7-дихлоркинуреновая кислота ACEA 1021 HA-966	Ифенпродил LY 215490
Нет	CPP NPC 12626	PCP Кетамин МК-801 SKF 10,047	ACPC 7-хлоркинуреновая кислота кинуреновая кислота глицин	Ифенпродил Рилузол NMDA LY 326325 NBQX

7.6. Опиатная толерантность и зависимость

Первые сообщения о способности NMDA антагонистов предотвращать развитие опиатной толерантности и зависимости появились в 1991 году [Marek et al., 1991; Trujillo, Akil, 1991]. С тех пор лавинообразный поток сообщений подтвердил и расширил эти данные, что привело к тому, что использование антагонистов NMDA рецепторов рассматривается сейчас как одно из наиболее перспективных направлений терапии опиатной зависимости и толерантности к анальгетическому действию [Herman et al., 1995]. К числу достоинств веществ этого класса относятся следующие: а) их действие не является следствием взаимодействия с опиатными рецепторами; б) анальгетическая активность опиатов не ухудшается при совместном введении с антагонистами рецепторов ВАР; в) эффект сохраняется длительное время. Несмотря на то, что роль NMDA рецепторов в развитии опиатной толерантности и зависимости сейчас общепризнана, конкретные механизмы остаются невыясненными. Обсуждаются как участие NMDA рецепторов в процессах клеточной пластичности, сопровождающих развитие

толерантности/зависимости, так и возможное значение обнаруженного недавно снижения количества NMDA рецепторов в спинном мозге, среднем мозге и гипоталамусе при хроническом введении морфина [Bhargava et al., 1995a].

Следует отметить, что антагонисты NMDA рецепторов предотвращают развитие толерантности, сенситизации, зависимости от этанола [Khanna et al., 1993; Liljequist, 1991; Karcz-Kubicha, Liljequist, 1995], барбитуратов [Rabbani et al., 1994], бензодиазепинов [File, Fernandez, 1994; Stephens, 1995], психостимулянтов [Druhan et al., 1993; Schenk et al., 1993; Karler et al., 1994; Ohmori et al., 1994; Segal et al., 1995; Wolf et al., 1995], μ - [Wolf, Jeziorski, 1993; Bessalov, Zvartau, 1995; Herman et al., 1995; Livezey et al., 1995] и к-опиатных агонистов [Kolesnikov et al., 1993; Bhargava, Thorat, 1994; Bhargava, 1995; Thorat, Bhargava, 1995] [см. также обзор в Trujillo, Akil, 1995]. Таким образом, влияние антагонистов NMDA рецепторов на развитие опиатной толерантности и зависимости может представлять собой лишь частный случай более общего феномена. С другой стороны, МК-801 не оказывает влияния на развитие толерантности к морфиновой гипертермии [Bhargava, Matwyshyn, 1993] и дискриминативным стимульным свойствам [Bessalov et al., 1996; Young et al., 1996]. Несмотря на значительно меньшее внимание, уделяемое антагонистам неNMDA рецепторов в этом вопросе, достоверно установлено, что неNMDA рецепторы также вовлечены в механизмы развития опиатной толерантности и зависимости [Akoaka, Aston-Jones, 1991; Cappendijk et al., 1993; Mao et al., 1994] и сенситизации к психостимулянтам [Karler et al., 1994].

Конкурентные NMDA антагонисты. Конкурентные NMDA антагонисты (NPC 17742, LY 274614, LY 235959) предотвращают развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина в экспериментах на крысах и мышах [Kolesnikov et al., 1993; Tiseo, Inturrisi, 1993; Elliott et al., 1994b; Tiseo et al., 1994; Matwyshyn, Bhargava, 1995]. По крайней мере одно из исследованных веществ (LY 274614) уменьшало проявления опиатной толерантности при однократном введении перед тестированием, т.е. подавляло экспрессию толерантности [Tiseo, Inturrisi, 1993]. При этом все исследователи подчеркивают отсутствие или значительное ослабление таких токсических реакций, как психомоторная стимуляция, стереотипии, дискоординация движений и др.

Исследование способности конкурентных антагонистов NMDA рецепторов влиять на экспрессию опиатного абстинентного синдрома дало несколько противоречивые результаты. На настоящий момент подобные исследования были выполнены лишь в двух лабораториях. Введение LY 274614 морфин-зависимым крысам перед преципитирующей инъекцией опиатного антагониста достоверно уменьшило вероятность проявления таких симптомов, как стучание зубами, птоз, пилоэрекция, диаррея, потеря веса, но не влияло на появление прыжковой активности, "корчей", и саливации [Rasmussen et al., 1991]. Аналогичное исследование, выполненное на мышах с применением другого антагониста LY 235959, дало только негативные результаты [Matwyshyn, Bhargava, 1995]. По всей видимости не следует приписывать некоторое расхождение в описываемых результатах использованию разных видов животных, так как конкурентные антагонисты NMDA рецепторов не влияют (LY 274614) или вызывают лишь незначительное снижение (AP5) нейрональной активности, регистрируемой в голубом пятне крыс при отмене опиатов [Rasmussen et al., 1991; Akoaka, Aston-Jones, 1991]. Всплеск нейрональной активности в голубом пятне считается одним из наиболее характерных последствий введения опиатных антагонистов животным, зависимым от опиатов [Rasmussen et al., 1990]. Интересно, что введение неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов (например, МК-801), а также

таких веществ как кинуреновая кислота и CNQX снижает нейронную активность в голубом пятне крыс, связанную с индукцией синдрома отмены опиатов [Akaoka, Aston-Jones, 1991]. Преципитированный опиатный абстинентный синдром сопровождается также специфическим повышением экспрессии протоонкогена c-fos в миндалине, прилежащем ядре, фронтальной коре и гиппокампе. Неконкурентные и конкурентные антагонисты NMDA рецепторов снижают экспрессию c-fos в миндалине и прилежащем ядре [Rasmussen et al., 1995].

Неконкурентные NMDA антагонисты. Большинство экспериментаторов использовали МК-801 в качестве модельного представителя фенциклидиноподобных неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов. Развитие толерантности к аналгетическому эффекту морфина эффективно замедлялось при совместном введении с МК-801 в экспериментах на крысах, мышах и морских свинках [Trujillo, Akil, 1991, 1994; Marek et al., 1991a,b; Ben-Eliyahu et al., 1991; Bhargava, Matwyshyn, 1993; Lutfy et al., 1993; Gutstein, Trujillo, 1993; Tiseo, Inturrisi, 1993]. Эффект МК-801 проявлялся как при системных путях введения (болюсное и с помощью хронически имплантированных осмотических минипомп) [Trujillo, Akil, 1994], так и при интратекальном введении комбинации морфина с МК-801 [Беспалов с соавт., 1993; Gutstein, Trujillo, 1993; Mao et al., 1994]. Предварительные данные указывают на спинальную локализацию действия МК-801, так как эффект сохраняется даже на животных с перерезкой спинного мозга [Gutstein, Trujillo, 1993]. Эти данные говорят в пользу того, что действие антагонистов NMDA рецепторов не ограничивается влиянием на ассоциативные процессы, сопровождающие развитие толерантности (см. ниже). При этом было показано, что как однократное, так и хроническое введение МК-801 не изменяло уровней болевого реагирования *per se* [Trujillo, Akil, 1991a, 1994; Marek et al., 1991a,b; Ben-Eliyahu et al., 1991; Bhargava, Matwyshyn, 1993; Gutstein, Trujillo, 1993; Tiseo, Inturrisi, 1993]. Интересно, что при совместном введении интервал между ежедневными инъекциями морфина и МК-801 можно широко варьировать. Так, например, развитие опиатной толерантности замедлялось даже при введении МК-801 два часа спустя инъекции морфина [Marek et al., 1991b].

Известно, что опиатная толерантность является обратимым процессом, т.е. чувствительность к аналгетическому действию морфина восстанавливается через некоторое время после выведения морфина из организма. Пока остается неизвестным, ускоряет ли МК-801 обратное развитие опиатной толерантности [Trujillo, Akil, 1994; Herman et al., 1995].

Аналогичные данные о замедлении развития опиатной толерантности получены и для фенциклидина [Trujillo, Akil, 1994], кетамина [Trujillo, Akil, 1994] и декстрорфана/декстрометорфана [Elliott et al., 1994a; Trujillo, Akil, 1994]. Отметим также, что фенциклидин предотвращал развитие как неассоциативного, так и ассоциативного (т.е. запускаемого обстановочными стимулами, ассоциированными с инъекциями морфина) компонентов опиатной толерантности [Беспалов с соавт., 1994]. Особый интерес представляют кетамин и декстрорфан, которые давно применяются в клинической практике. Аналгетические свойства кетамина проявляются при введении препарата в дозах, которые характеризуются также возникновением ряда нежелательных психотомиметических эффектов. Однако, экспериментальные данные свидетельствуют, что кетамин предотвращает развитие опиатной толерантности в субаналгетических дозах, не вызывающих развития побочных реакций [Trujillo, Akil, 1994]. Интерес к декстрорфану (который в

большинстве стран продается без рецепта врача) усиливается практически полным отсутствием у него каких-либо побочных действий, а также его способностью устранять проявления опиатной толерантности после однократной инъекции [Elliott et al., 1994a].

Эксперименты по влиянию антагонистов NMDA рецепторов на проявления опиатной зависимости можно разделить на две основные группы согласно схеме введения антагониста. В первой группе экспериментов антагонист (МК-801, кетамин, декстрорфан) вводили животным (морские свинки, крысы), зависимым от морфина, перед тестом, в котором оценивалась способность опиатного антагониста налоксона преципитировать симптомы опиатного абстинентного синдрома. Неконкурентные антагонисты NMDA рецепторов значительно уменьшали практически все проявления абстинентного синдрома, включая поведенческие корреляты (прыжки, потряхивания, потягивания и др.), сомато-вегетативные реакции (птоз, пилоэрекция, стучание зубами и др.) и нейрохимические изменения (повышение уровня ацетилхолина в коре головного мозга) [Koyuncuoglu et al., 1990; Rasmussen et al., 1991; Tanganelli et al., 1991; Trujillo, Akil, 1991a; Brent, Chahl, 1993; Belozertseva et al., 1995]. Несмотря на отсутствие достаточных экспериментальных данных, отметим, что эффекты введения антагонистов морфин-зависимым животным следует рассматривать с некоторой осторожностью, так как собственные негативные влияния NMDA антагонистов могут существенно усиливаться на фоне преципитированного абстинентного синдрома [Belozertseva et al., 1995]. Известны также данные, указывающие на возможную видоспецифичность рассматриваемого эффекта NMDA антагонистов. По крайней мере, в двух исследованиях этот эффект не воспроизводился, если в качестве экспериментальных объектов использовались мыши [Matwyshyn et al., 1993; Thorat et al., 1994]. Противоречивые данные получены также в предварительных экспериментах на людях, где изучали эффекты декстрорфана *per se* [нет эффекта; Rosen et al., 1995] или в комбинации с диазепамом и хлорпромазином [есть эффект; Koyuncuoglu, Saydam, 1990].

Во второй группе экспериментов антагонисты (МК-801) вводили системно или в/ж на протяжении всего периода индукции опиатной зависимости, но не в последние 24 часа перед тестированием. Хотя опиатный абстинентный синдром был менее выражен при подобном режиме введения NMDA антагониста [Trujillo, Akil, 1991a], очевидно, что в клинической ситуации более пригодной может оказаться первая схема с введением NMDA антагонистов после формирования опиатной зависимости с целью купирования симптомов острой отмены наркотика.

В заключение отметим, что при комбинированном введении морфина с неконкурентными NMDA антагонистами усиливается вероятность возникновения токсических побочных реакций. Так, например, ED_{50} для каталептического эффекта морфина и частота летальных исходов достоверно повышалось и при совместном введении с МК-801 в прямой зависимости от дозы последнего [Trujillo, Akil, 1991b]. Кажется парадоксальным, что другие эффекты морфина (например, аналгезия) не усиливаются в присутствии неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов.

Другие лиганды рецепторов ВАР. Частичный агонист глицинового сайта NMDA-рецепторного комплекса АСРС при совместном введении с морфином предотвращает развитие толерантности к аналгетическому эффекту опиата [Kolesnikov et al., 1994]. Кроме того, АСРС эффективно обращает проявления опиатной толерантности и при однократном введении перед тестированием аналгетической активности морфина. АСРС не имеет собственной аналгетической активности и не изменяет болеутоляющего действия морфина. Авторы этого

сообщения указывают также на практически полное отсутствие побочных действий у АСРС и наличие у этого вещества антидепрессантной и анксиолитической активности [Trullas et al., 1991]. Аналогичные результаты получены при испытании другого антагониста глицинового сайта ACEA-1328 [Lutfy et al., 1995]. Существуют также данные о способности глициновых антагонистов (фелбамат) значительно уменьшать экспрессию опиатного абстинентного синдрома [Kosten et al., 1995]. Опиатный абстинентный синдром был менее выражен после введения глицинового частичного агониста D-циклосерина, однако ряд симптомов потенцировался введением (\pm)-НА-966 [Kosten et al., 1995]. Ряд других веществ, неселективно связывающихся с глициновым сайтом, - кинуреновая кислота и CNQX также снижают проявления опиатной толерантности абстинентного синдрома [Marek et al., 1991a; Akaoka, Aston-Jones, 1991].

Несколько работ было посвящено антагонистам неNMDA рецепторов ВАР. Установлено, что АМРА и метаботропные рецепторы также играют существенную роль в формировании и/или экспрессии опиатной толерантности и/или зависимости. Системное введение DNQX снижало проявления как толерантности к анальгетическому эффекту морфина, так и опиатного абстинентного синдрома [Беспалов, 1994]. Селективный АМРА антагонист LY 215490 уменьшает нейронную активность в голубом пятне абстинентных крыс [Rasmussen, 1995]. В то же время сочетанное введение АМРА антагониста GYKI 52466 (внутрижелудочковый путь введения) с морфином на протяжении всего периода индукции физической зависимости не повлияло на экспрессию абстинентного синдрома после преципитирующей инъекции налоксона [Fundytus, Coderre, 1994]. Теми же авторами сообщено, что антагонисты метаботропных рецепторов ВАР (S)-4C-PG ((S)-4-карбоксифенилглицин) и 1-АРЗ эффективно противодействовали формированию опиатной зависимости при внутрижелудочковом введении у крыс.

Ингибиторы NO синтетазы не связываются напрямую с рецепторами ВАР и поэтому, не будучи лигандами этих рецепторов, формально не являются предметом настоящего обсуждения. Однако связь между системой оксида азота (NO; эндотелиальный релаксирующий фактор) и ВАРгической передачей настолько тесна, что не позволяет оставить ее без внимания. При целом ряде физиологических и патологических состояний наблюдается нарастание внеклеточной концентрации NO. Примером такого состояния является опиатный абстинентный синдром. NO. Считается, что ферментативное высвобождение NO опосредовано NMDA рецепторами, антагонисты которых способны в свою очередь снижать концентрацию его [Garthwaite, 1991]. Существуют также данные, что некоторые антагонисты NMDA рецепторов (например, фенциклидин) являются прямыми ингибиторами синтеза NO [Osawa, Davila, 1993]. Некоторые эффекты агонистов NMDA рецепторов (повышение уровня цГМФ в срезах гиппокампа крыс; нейротоксичность) предотвращаются ингибиторами NO синтетазы [Dawson et al., 1991; Garthwaite et al., 1991]. Участие NO в патогенезе опиатного абстинентного синдрома подчеркивается тем, что искусственное повышение концентрации NO путем введения его донора изосорбита динитрата проявляется так называемым квази-абстинентным синдромом [Adams et al., 1993]. С другой стороны, ингибиторы синтеза NO эффективно подавляют проявления опиатного синдрома отмены [Vaupel et al., 1995]. Кроме того, ингибиторы синтеза NO замедляют развитие опиатной толерантности [Herman et al., 1995]. Несколько представителей этого класса (7-нитроиндазол и метиленовый синий, избирательно взаимодействующие с NO синтетазой, специфичной для нервной ткани) были выбраны для дальнейшего преклинического и клинического исследования.

7.7. Основные лимитирующие факторы и возможные направления разработки лекарственных средств на основе лигандов рецепторов ВАР

Психотомиметическая активность и наркогенный потенциал. Появление фенциклидина на фармацевтическом рынке в конце 50-х годов послужило одним из стимулов, повлекших за собой пристальное исследование фармакологических основ действия этого препарата и, в определенной мере, до сих пор определяющих стратегию поиска лекарственных средств среди лигандов рецепторов ВАР [Gorelick, Balster, 1995]. Фенциклидин был создан компанией Parke and Davis (коммерческое название "Сернил") и предназначался для использования в качестве общего анестетика. Несмотря на эффективность препарата, а также ряд преимуществ, связанных с вызываемым им состоянием так называемой диссоциативной анестезии (например, сохранение жизненно важных рефлексов на стадии хирургического наркоза), о клиническом применении фенциклидина пришлось забыть ввиду его психотомиметической активности, напоминавшей эпизоды обострения шизофрении. Однако наркогенный потенциал фенциклидина (известен также под названиями "angel dust", "PeaCe Pill", "wack") утвердил это вещество как один из самых популярных наркотиков конца 20-го века. Более того, вызываемые фенциклидином состояние отрыва от действительности, расстройства восприятия послужили основой для создания целого ряда активных галлюциногенных аналогов, известных под общим названием "designer drugs". Фенциклидин оказался также и незаменимым инструментом в руках биомедицинских исследователей. Психотомиметические эффекты фенциклидина привели к использованию фенциклидиновой интоксикации в качестве модели шизофрении [Balster, Willetts, 1995]. Химически близкий аналог фенциклидина кетамин (известен в нашей стране под коммерческими названиями "Калипсол", "Кеталар") используется во всем мире для обезболивания при непродолжительных хирургических и диагностических процедурах. Фенциклидиноподобные неконкурентные антагонисты NMDA рецепторов (например, МК-801) стали первыми представителями этого класса нейроактивных соединений, которые прошли расширенные преклинические испытания как противосудорожные и нейропротективные средства. Следует отметить, что по крайней мере для неконкурентных NMDA антагонистов психотомиметический и наркогенный потенциал остается одним из основных лимитирующих факторов. Характерным для этого класса антагонистов NMDA рецепторов являются выраженные психомоторная стимуляция, стереотипные движения головой ("head weaving"), расстройства координации и седативное действие [Balster, Willetts, 1995; Gorelick, Balster, 1995].

Наиболее адекватными методами для изучения фенциклидиноподобных негативных проявлений считаются:

1) исследование способности вещества служить первичным подкрепляющим агентом. Так называемая реакция самовведения основана на том, что экспериментальный субъект (крыса, мышь, обезьяна) выполняет определенную инструментальную реакцию для того, чтобы получить инъекцию (внутривенную, внутримозговую) вещества. Способность поддерживать реакцию самовведения у животных является характерной для большинства наркотиков и служит высокоэффективным предиктором наркогенного потенциала у человека;

2) изучение дискриминативных стимульных свойств веществ (см. выше). Существующие методики позволяют адекватно оценивать фармакологическую природу субъективных состояний, вызываемых психоактивными веществами.

Реакция самовведения. Фенциклидин и фенциклидиноподобные NMDA антагонисты (кетамин и другие арилциклоалкиламины, SKF 10,047, MK-801, дексоксадрол, этоксадрол) самовводятся животными всех видов, которые когда-либо служили объектами эксперимента [Balster et al., 1973; Balster et al., 1994].

В то же время конкурентные NMDA антагонисты, антагонисты глицинового и полиаминового сайтов NMDA-рецепторного комплекса не поддерживают реакцию самовведения [Willetts et al., 1990; Balster et al., 1994; Balster, Willetts, 1995], что указывает на отсутствие или значительно меньший наркогенный потенциал этих классов NMDA антагонистов по сравнению с канальными блокаторами.

Стимульные свойства. Все вещества, имеющие сродство к фенциклидиновому месту связывания NMDA-рецепторного комплекса, вызывают субъективные эффекты, которые распознаются животными как фенциклидиноподобные [Willetts et al., 1990]. Выраженность фенциклидиноподобных стимульных свойств коррелирует с параметрами связывания с фенциклидиновым сайтом [Balster, 1992; Woods et al., 1991]. Аналогичные данные получены в отношении мемантина, низкоаффинного блокатора канала, ассоциированного с NMDA рецептором [Sanger et al., 1992]. Однако следует отметить, что в отличие от фенциклидиноподобных высокоаффинных канальных блокаторов, наркогенный потенциал которых у людей хорошо документирован, мемантин разрешен к применению в клинической практике как противовирусное и антипаркинсоническое средство и является довольно безопасным из-за отсутствия негативных побочных эффектов.

Антагонисты NMDA рецепторов, не имеющие сродства к фенциклидиновому месту связывания, имеют стимульные свойства, отличные от фенциклидина [Willetts et al., 1990]. Эти результаты получены в экспериментах на животных, обученных различать субъективные состояния, возникающие после введения фенциклидина (или кетамина) и его растворителя. Однако, если животные обучены выбирать между состояниями "конкурентный NMDA антагонист" и "растворитель", введение фенциклидина приводит к тому, что реакция части животных все же указывает на определенное сходство стимульных свойств этих двух классов NMDA антагонистов [Willetts et al., 1989c; Wiley, Balster, 1994; Balster, Willetts, 1995]. Клинические данные также свидетельствуют о наличии нежелательных психологических эффектов, возникающих после введения конкурентных NMDA антагонистов [см., например, Sveinbjornsdottir et al., 1993].

Реакция электрической самостимуляции мозга является еще одним методическим подходом для исследования наркогенного потенциала исследуемых веществ. Практически все известные вещества, вызывающие зависимость у человека, способны активировать эту реакцию, основанную на электрическом раздражении структур мозга (зон "удовольствия"), входящих в так называемую "систему награды", в ответ на выполнение животным определенного действия (инструментальной реакции). Только фенциклидин и фенциклидиноподобные (неконкурентные NMDA антагонисты (MK-801, кетамин) растормаживают реакцию самостимуляции, в то время как конкурентные антагонисты NMDA рецепторов и антагонисты неNMDA рецепторов не обладают подобными свойствами при системном и локальном внутримозговом путях введения [Herberg, Rose, 1989, 1990; Bespalov et al., 1994b].

Нейротоксическое действие. В последние годы появилось большое количество сообщений о том, что не только агонисты рецепторов ВАР, но и антагонисты этих рецепторов, в первую очередь NMDA рецепторов, вызывают нейродегенеративные изменения в кортиколимбических областях мозга крыс [Olney et al., 1989, 1991; Auer, Coulter, 1994; Olney, Farber, 1995]. Однократное введение низких доз как неконкурентных, так и конкурентных NMDA антагонистов приводит к обратимой вакуолизации нейронов цингулярной коры, в то время как большие дозы способны запускать некротизирующие изменения, захватывающие большие участки мозговой ткани [Fix et al., 1993; Wozniak et al., 1993; Corso et al., 1994; Sharp et al., 1994]. Стойкие нейродегенеративные изменения были обнаружены после повторных (3-4 дня) введений фенциклидина и МК-801 в цингулярной коре, гиппокампе, парагиппокампальной извилине, энторинальной коре [Horvath, Buzsaki, 1993; Ellison, 1994]. Интересно, что распространение нейродегенеративных изменений в мозге крыс довольно характерно для мозга больных шизофренией [Bogerts, 1993]. Механизмы нейротоксического действия NMDA антагонистов пока не изучены, однако найдены несколько классов веществ, эффективно блокирующих развитие нейродегенеративных изменений: антагонисты неNMDA подтипов рецепторов ВАР, м-холиноблокаторы, бензодиазепины, μ -опиатные антагонисты, барбитураты, α_2 -адреномиметики, типичные (галоперидол, тиоридазин, локсапин) и атипичные (клозапин) нейролептики [Olney, Farber, 1995]. На основании этих данных предполагается, что несколько нейротрансмиттерных систем задействованы в патогенезе нейротоксического действия NMDA антагонистов. Интересно, что нейротоксическое действие NMDA антагонистов не проявляется у половозрелых крыс (приблизительно 1.5 мес).

Рассматривая возможности клинического применения антагонистов NMDA рецепторов в комбинации с препаратами, представляющими один или несколько из вышеперечисленных классов, следует отметить, что именно м-холиноблокаторы и α_2 -адреномиметики являются наиболее перспективными по нескольким причинам. Например, наркотический потенциал бензодиазепинов и барбитуратов, а также собственные побочные эффекты нейролептиков могут реально сузить терапевтический диапазон антагонистов NMDA рецепторов. В то время как было показано, что м-холиноблокаторы способны не только предотвращать нейротоксическое действие NMDA антагонистов, но и ослабляют психомоторные реакции у животных [Lapin, Rogawski, 1992]. Аналогичный интерес может представлять комбинация с α_2 -адреномиметиками, которые как и NMDA антагонисты весьма эффективны в терапии нейропатической боли [Puke, Wiesenfeld-Hallin, 1993].

Антагонисты глицинового и полиаминового сайтов NMDA-рецепторного комплекса не обладают нейротоксическим действием [Duval et al., 1992; Hargreaves et al., 1993].

В заключение отметим, что в последнее время появился ряд сообщений, которые ставят под сомнение значимость данных о нейротоксическом действии антагонистов NMDA рецепторов. Во-первых, описанная выше вакуолизация нейронов может оказаться всего лишь артефактом вследствие особенностей гистологической обработки срезов мозга [Auer, 1994; Auer, Coulter, 1994]. Во-вторых, подчеркивается обратимый характер вакуолизации и развитие своеобразной толерантности к нейротоксическому действию антагонистов, выражающейся в том, что вакуолизация наблюдается при однократном, но не длительном введении [Olney et al., 1989, 1991; Auer, Coulter, 1994].

Расстройства памяти и обучения. Роль рецепторов ВАР в механизмах памяти и обучения хорошо документирована (см. главу 5). Считается, что применение антагонистов рецепторов ВАР может повлечь за собой нарушение процессов обучения, формирования и воспроизведения долговременных и кратковременных памятных следов [Danysz et al., 1995]. Однако следует отметить, что данные о влиянии антагонистов NMDA рецепторов на воспроизведение навыков в эксперименте довольно противоречивы. Некоторые исследователи считают, что нарушения рабочей памяти могут возникать из-за целого ряда неспецифических факторов, обусловленных как моторными нарушениями, вызываемыми антагонистами NMDA рецепторов, так и методологическими особенностями эксперимента. Кроме того, существуют экспериментальные свидетельства о том, что при определенных обстоятельствах антагонисты NMDA рецепторов облегчают обучение [Mondadori et al., 1989; Mondadori, Weiskrantz, 1993; Danysz et al., 1995]. Этот эффект наблюдается при введении относительно низких доз антагонистов и связывается в первую очередь с тем, что фоновая физиологическая стимуляция NMDA рецепторов ухудшает временные и пространственные характеристики стимуляции NMDA рецепторов во время обучения. Интересно отметить, что помимо экспериментальных данных существуют аналогичные результаты клинического применения мемантина в терапии деменции [Ditzler, 1991].

Несмотря на хорошо известную роль AMPA рецепторов в механизмах долговременной потенциации, системное введение антагонистов этих рецепторов не ухудшает способности животных к обучению [Danysz et al., 1995]. Расстройства памяти и обучения также вряд ли окажется преградой для клинического применения антагонистов глицинового и полиаминового сайта NMDA-рецепторного комплекса.

Совершенно очевидно, что терапевтический потенциал ВАРгических соединений может быть значительно шире. Выше мы уже упоминали, что рецепторы ВАР играют важную роль в регуляции кардиоваскулярной, нейроэндокринной и других систем. Следовательно, возможно и терапевтическая коррекция нарушений функционирования этих систем ВАРгическими препаратами.

Наиболее клинически перспективные классы лигандов рецепторов ВАР.

1. Антагонисты и частичные агонисты глицинового сайта NMDA-рецепторного комплекса. В ряде стран уже разрешен к клиническому применению при эпилепсии препарат фелбамат ("Фелбатол"). Серьезной преградой для использования этого препарата могут стать сообщения о случаях апластической анемии, развившейся вследствие его применения. Без всякого сомнения эти побочные реакции характерны для фелбамата, однако они не являются свойством всех глициновых антагонистов.

2. Антагонисты полиаминового сайта NMDA-рецепторного комплекса. Предполагается, что представители этого класса ифенпродил и элипродил более избирательно взаимодействуют с NMDA рецептором, образованным из NMDAR1a и NMDAR2B субъединиц [Williams, 1993; Lynch et al., 1995; Nankai et al., 1995], чем возможно и объясняется исключительно благоприятный профиль действия этих веществ.

3. Низкоаффинные неконкурентные NMDA антагонисты канального типа. Один из представителей этого класса - мемантин, уже применяется в клинике как противовирусный препарат. Предполагается, что эти вещества эффективны в большей степени в условиях, когда значительная часть каналов находится в открытом состоянии, и поэтому менее склонны вызывать фенциклидиноподобные

побочные реакции [Rogawski et al., 1991]. Некоторые высокоаффинные неконкурентные NMDA антагонисты (например, декстрорфан) также представляют интерес в силу того, что уже давно находятся на фармацевтическом рынке и применяются по ряду показаний без заметных побочных реакций.

4. Конкурентные NMDA антагонисты, избирательно взаимодействующие с определенным подтипом NMDA рецепторов. Отправной точкой для разработки этого класса соединений является представление о различной функциональной роли подтипов NMDA рецепторов.

5. Антагонисты AMPA рецепторов.

6. Позитивные модуляторы AMPA рецепторов (AMPAкины) и вещества, подавляющие десенситизацию AMPA рецепторов.

7. Метаболические прекурсоры эндогенных лигандов рецепторов ВАК. Примерами подобного подхода являются 3-индол-пировиноградная кислота, прекурсор кинуреновой кислоты (Polifarma, Италия) и милацемид, прекурсор глицина.

8. Частичные агонисты различных рецепторов ВАК, у которых сохранены ценные терапевтические свойства, но ослаблено побочное действие.

ГЛАВА 8. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНАЛОГОВ И ПРОИЗВОДНЫХ ВОЗБУЖДАЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ

Как уже отмечалось в предыдущих главах, подавляющее большинство из известных лигандов рецепторов ВАК в силу разных причин не могут использоваться в качестве лекарственных препаратов. Для решения этой задачи необходимо, на наш взгляд, решить две основные проблемы: найти новые лиганды рецепторов ВАК, проявляющих свойства частичных агонистов, и улучшить фармакокинетические свойства этих соединений, что позволит им достаточно легко проникать в ЦНС и накапливаться там в достаточных концентрациях.

Для решения этих задач нами был предпринят синтез и изучение фармакологических свойств аналогов и производных некоторых ВАК с целью определения основных структурных параметров молекул, определяющих их способность избирательно взаимодействовать с тем или иным типом рецепторов ВАК, а также синтез некоторых их липофильных производных, способных проникать через ГЭБ и проявлять активность при системном введении.

8.1. Аналоги ODAР

Как уже отмечалось в гл. 2, одним из лигандов АМРА рецепторов является природная аминокислота ODAР. Она обладает редкой для ВАК способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в некоторых структурах мозга, что связано с ее метаболической стабильностью. Молекула ODAР отличается от других агонистов АМРА типа тем, что в ней расстояние между терминальными карбоксильными группами больше, нежели в молекулах других агонистов [Watkins et al., 1991].

Природный нейротоксин является 3N-оксалилпроизводным L-2,3-диаминопропионовой кислоты [Harrison et al., 1977; Rao, 1975; Wu et al., 1976], в отличие от него 2N-оксалилпроизводное не обладает нейротоксическими свойствами [Wu et al., 1976]. Биологическое действие ODAР зависит также от строения хирального центра. Было показано, что выраженной нейротоксичностью обладает лишь L-изомер [Nunn et al., 1987; Rao, 1975], тогда как D-изомер не влияет на связывание радиолигандов с рецепторами ВАК [Ross et al., 1989].

Возможны несколько вариантов модификации молекулы ODAР: 1) удлинение остатка 2,3-диаминопропионовой кислоты (диаминовый фрагмент), 2) замена амидной группы на другую полярную группу и 3) замена оксалильного остатка (дикарбонильный фрагмент).

Первый вариант был уже реализован ранее [Bridges et al. 1989]. При этом было показано, что замена остатка 2,3-диаминопропионовой кислоты на остаток 2,4-диаминомасляной кислоты приводит к исчезновению АМРА-агонистической активности. Во втором варианте должна заменяться амидная группа на какую-либо аналогичную полярную группу, например, сложноэфирную. Однако такая замена приводит к неустойчивым соединениям, в которых легко протекает O-N ацильная миграция, приводящая к 2N-производным, который, как уже указывалось выше, не обладают ВАКергической активностью. Поэтому нами был выбран третий путь - замена оксалильного остатка на остатки других дикарбоновых кислот, отличающихся расстоянием между карбонильными атомами углерода. Были использованы такие дикарбоновые кислоты, как янтарная, глутаровая и орто-фталева и синтезированы 3N-сукцинил-, 3N-глутарил- и 3N-фталамоил-L-2,3-диаминопропионовые кислоты [SuDAP, GiDAP и PiDAP, соответственно].

отличающиеся друг от друга расстоянием между α - и ω -карбоксильными группами [Piotrovsky et al., 1992].

Радиолигандный анализ новых аналогов ODAP показал, что все они достаточно эффективно ингибируют связывание $^3\text{H-L-Glu}$ с синаптическими мембранами гиппокампа человека [Корешонков и др., 1995a].

Исследование фармакологических свойств этих соединений проводилось на нескольких моделях. В первую очередь была изучена их способность вызывать у мышей судороги при прямом введении в желудочки мозга (в/ж). ODAP и SuDAP вызывают развитие судорожной реакции после латентного периода 5-20 и 15-35 сек. соответственно. Только ODAP превосходила по силе судорожного эффекта L-глутамат. Необходимо отметить, что картина судорожного действия ODAP и SuDAP отличалась от картины судорог, вызываемых NMDLA и L-глутаматом, и более напоминала судорожное действие каината, т.е. отсутствовала или была невыражена стадия дикого бега ("wild running"), однако судороги были генерализованными, с преобладанием клонико-тонического компонента, а также отличались значительной продолжительностью (свыше 20 минут). Практически отсутствовала стадия тонических судорог. Фармакологический анализ показал, что судорожное действие ODAP блокировалось ДЭЭГ (в/ж, 100 мкг) и не блокировалось γ -DGG (в/ж, 100 мкг). Судорожное действие SuDAP не блокировалось ДЭЭГ (в/ж, 100 мкг). GIDAP и PtDAP в дозах до 200 мг/кг при в/ж введении судорог у мышей не вызывали (табл.8.1).

Таблица 8.1. Сравнение судорожных свойств производных ODAP (в/ж, мыши)

Соединение	ED ₅₀ (мкмоль)	Относительная активность
L-Glu	0.034 (0.022-0.053)	100.0
ODAP	0.013 (0.008-0.020)*	261.5 (168.7-405.3)
SuDAP	0.209 (0.191-0.229)*	16.3 (10.2- 26.1)
GIDAP	нет эффекта	-
PtDAP	нет эффекта	-

* $p < 0.05$

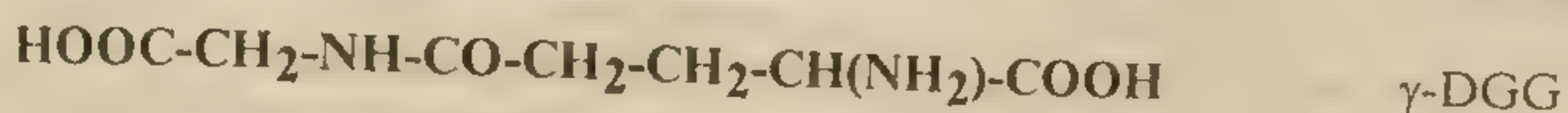
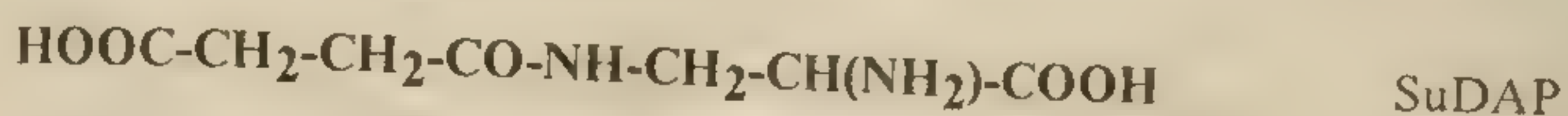
Поскольку, GIDAP и PtDAP при в/ж введении не вызывали судорог, было проведено исследование их противосудорожного действия на различных моделях ВАК-индуцированных судорог. Противосудорожная активность изучалась при одновременном в/ж введении с конвульсантом. В качестве конвульсантов использовались: NMDLA, каинат и ODAP, как агонист рецепторов AMPA типа. GIDAP и PtDAP в высоких дозах (1.0 мкмоль) подавляли судорожное действие только NMDLA, немного уступая в этом отношении γ -DGG и не влияли на судороги, вызываемые каинатом и ODAP [Piotrovsky et al., 1992].

Из анализа результатов исследования зависимости активности этих соединений от их химической структуры следует, что в ряду аналогов ODAP удлинение молекулы введением дополнительных метиленовых групп в дикарбонильный фрагмент приводит сначала к ослаблению судорожной активности (SuDAP), а затем - к ее исчезновению и даже появлению противосудорожных свойств (GIDAP и PtDAP). Более того, анализ действия двух последних соединений показывает, что они обладают скорее общим депрессивным действием.

Для GlDAP и PtDAP нами было проведено сравнительное изучение их влияния при в/ж и в/б введениях на ноцицептивные реакции и двигательную активность. Оба соединения обладают сильно выраженным антиноцицептивным действием при в/ж введении, но при в/б введении этот эффект наблюдался только у первого соединения. Оба соединения как при в/ж, так и в/б введениях сильно подавляют двигательную активность [Piotrovsky et al., 1992].

Из литературных данных известно, что подобными свойствами обладают NMDA антагонисты. Этот вывод был подтвержден также исследованием этих соединений в различных ноцицептивных тестах [Беспалов и др., 1994; Bernalov et al., 1994].

Наиболее интересным соединением из аналогов ODAP является, безусловно, SuDAP, проявляющее двойственное действие. При в/ж введении мышам оно способно не только вызывать судороги, но в той же дозе, при совместном введении с NMDA, блокировать судорожное действие последнего. По химической структуре SuDAP является изостером γ -DGG:



Следует отметить, что подобное химическое сходство в данном случае находит отражение и в биологических свойствах - γ -DGG в дозе 0.41 мкмоль в/ж также вызывает у мышей судороги. При этом судорожное действие как SuDAP, так и γ -DGG не блокируется антагонистами ВАР как NMDA, так и неNMDA типов. Следовательно, судорожное действие этих соединений не связано напрямую с активацией ВАРгической системы в ЦНС, и поэтому SuDAP не может быть отнесен к частичным агонистам, хотя у него и сохраняется способность ингибировать связывание $^3\text{H-L-Glu}$.

На основании этих данных можно сделать также вывод о нарушении конгенеричности в полученной нами серии аналогов ODAP - в случае SuDAP происходит, по всей видимости, изменение механизма судорожного действия.

Однако дальнейшее увеличение расстояния между фармакофорными группами в молекуле ODAP превращает этот агонист АМРА типа в NMDA блокаторы GlDAP и PtDAP, то есть конгенеричность (действие на одну и ту же медиаторную систему) в этом ряду сохраняется. Следовательно, в рассматриваемом нами случае введение дополнительных атомов углерода в дикарбонильный фрагмент молекулы ODAP, агониста АМРА типа, приводит к соединениям, проявляющих NMDA-антагонистическую активность - GlDAP и PtDAP. Однонаправленность эффектов двух последних соединений при в/ж и в/б введениях свидетельствует об их способности проникать в мозг при системном введении.

8.2. Пептидные аналоги N-ацетил-L-аспартил-L-глутаминовой кислоты

Дипептид NAAG обнаружен в мозге млекопитающих уже около 30 лет тому назад [Curatolo, Marchetti et al. 1967]. В последние годы, как уже упоминалось выше, он вновь привлек внимание многих исследователей в связи с приведенными в работах [Zaczek et al., 1983; French-Mullen et al., 1985; Koller, Coyle, 1985] данными о его возможной роли эндогенного лиганда рецепторов ВАР.

Молекула этого соединения сильно отличается от молекул других лигандов рецепторов, а именно - N-концевая аминокислотная группа в NAAG блокирована ацетильным остатком, то есть в молекуле отсутствует свободная аминокислотная группа. Однако считается, что в молекулах лигандов рецепторов ВАР основная

аминогруппа (первичная или вторичная) является обязательным элементом ВАКергического фармакофора. Поэтому нами был предпринят синтез целого ряда дипептидных аналогов NAAG, отличающихся расстояниями между кислотными группами и N-концом пептида. структура N-концевой аминокислоты и N-концевой блокирующей группы (табл. 8.2) [Пиотровский и др., 1988; Piotrovsky et al., 1991; Gargayev et al., 1991].

Исследование биологической активности NAAG, ее β -изомера и их дипептидных аналогов проводили при в/ж введении мышам. Как и при исследовании аналогов ODAР, в первую очередь оценивалась способность соединений вызывать судороги при в/ж введении мышам, и чувствительность этих судорожных припадков к действию антагонистов рецепторов ВАК различных типов (γ -DGG и ДЭЭГ). Для соединений, не проявивших судорожного действия, оценивалась их противосудорожное действие на моделях ВАКиндуцированных судорог.

NAAG при в/ж введении не проявляла собственного судорожного действия (вплоть до доз 200 мкг). Несколько неожиданным оказалась ее способность блокировать глутамат-индуцированные судороги. Этот эффект имел четко выраженную зависимость от интервала между временем введения NAAG и временем введения конвульсанта. При одновременном введении с L-глутаматом NAAG не влиял на его действие, эффект проявлялся лишь при введении конвульсанта не ранее, чем через 5 мин после введения NAAG и достигал максимума при введении за 40 мин до введения конвульсанта.

Однако большинство аналогов NAAG проявило при в/ж введении выраженную способность вызывать судороги у мышей (табл. 8.2). После латентного периода, длительность которого колебалась от 15 до 25 сек и увеличивалась обратно пропорционально уменьшению дозы, наступала фаза "дикого бега", которая затем переходила в стадию миоклонических или генерализованных клонико-тонических судорог длительностью до двух минут. Картина судорожного припадка, вызываемого этими дипептидами, напоминала таковую для самого L-глутамата. Отличие заключалось в более медленном развитии судорожного процесса (латентный период для L-глутамата составлял 35-45 секунд). Кроме того, судороги, вызываемые L-глутаматом были более длительными (7-15 минут).

Фармакологический анализ судорожного действия аналогов NAAG проводился с использованием γ -DGG (100 мкг, в/ж) и ДЭЭГ (100 мкг, в/ж). Предварительное введение ДЭЭГ блокировало, а введение γ -DGG не блокировало судорожные эффекты в/ж инъекции ED₉₉ дипептидов. Это свидетельствует о том, что развитие судорожного припадка, вызываемого этими соединениями, напрямую связано с возбуждением ВАКергической системы, причем преимущественно через AMPA/каинатные рецепторы.

Более короткий латентный период судорожного действия у исследуемых соединений по сравнению с L-глутаматом говорит об их прямом возбуждающем действии. Если бы эти соединения вызывали судороги при в/ж введении в результате гидролитического распада до L-глутаминовой кислоты (в случае производных аспарагиновой кислоты - до L-аспарагиновой) латентный период для них был бы больше, чем у L-глутамата. Трудно было бы ожидать от них также эффекта, большего или, по крайней мере, сравнимого с эффектом L-глутамата.

Из данных, приведенных в табл. 8.2, видно, что дипептиды со свободной аминогруппой значительно менее активны, чем их ацилированные аналоги (ср. Ac-Gly-D-Glu и HGly-D-Glu, Ac- β -Ala-L-Glu и H- β -Ala-L-Glu, Ac-GABA-L-Glu и HGABA-L-Glu). Оптимальным для проявления судорожного эффекта является наличие ацетильной группы на N-конце молекулы; уменьшение или увеличение

объема заместителя (формильная или бензоильная группы в дипептидах Bz-Gly-L-Glu и Form-Gly-L-Glu) приводит к снижению возбуждающих свойств соединения.

Таблица 8.2. Судорожная активность дипептидов - аналогов NAAG (в/ж. мыши).

Соединение	ED ₅₀ (мкмоль)	Относительная активность
L-Glu	0.034 (0.023-0.051)	100.0
Ac-Gly-D-Glu	0.022 (0.009-0.053)*	154.5 (103.0-231.7)
Ac-Gly-L-Asp	0.025 (0.013-0.047)*	133.3 (88.8-199.9)
Ac-β-L-Asp-L-Glu (β-NAAG)	0.034 (0.017-0.066)*	109.0 (71.7-165.6)
Ac-Gly-L-Glu	0.040 (0.024-0.067)*	85.0 (56.2-129.2)
Ac-β-Ala-L-Asp	0.040 (0.024-0.067)*	85.0 (56.2-129.2)
Ac-β-Ala-L-Glu	0.060 (0.034-0.105)*	56.6 (38.7- 82.6)
Ac-GABA-L-Glu	0.107 (0.068-0.168)*	31.7 (21.8- 45.9)
Bz-Gly-L-Glu	0.124 (0.085-0.186)*	27.4 (18.3- 40.8)
Ac-L-Ala-L-Glu	0.136 (0.092-0.200)*	25.0 (16.5- 37.7)
HGly-L-Glu	0.171 (0.114-0.257)*	19.8 (12.7- 30.6)
Form-Gly-L-Glu	0.189 (0.128-0.278)*	17.9 (11.7- 27.2)
HGly-D-Glu	0.195 (0.141-0.279)*	17.4 (11.2- 26.7)
Ac-D-Nval-L-Glu	0.200 (0.133-0.300)*	17.0 (10.6- 27.2)
H-β-Ala-L-Glu	0.264 (0.179-0.388)*	12.8 (8.47- 19.3)
HGABA-L-Glu	0.298 (0.186-0.477)*	11.4 (7.45- 17.4)

* $p < 0.05$ относительно L-Glu

Наиболее активны соединения с минимальной длиной цепочки, а именно дипептиды с N-концевым глицином (ср. соединения Ac-Gly-D-Glu и Ac-GABA-L-Glu; Ac-Gly-L-Asp и Ac-β-Ala-L-Glu). При наличии в молекуле разветвлений в N-концевой аминокислоте (дипептид Ac-D-Nval-L-Glu) судорожная активность падает. Сравнение структуры всех исследованных дипептидов показывает, что появление полярной карбоксильной группы на расстоянии одного атома от основной цепи (β-NAAG) придает соединению достаточно выраженные судорожные свойства, которые опосредуются, по данным фармакологического анализа, через рецепторы AMPA типа. Удаление этой группы от основной цепи еще на один атом (NAAG) полностью лишает соединение судорожных свойств (механизм проявления отсроченного противосудорожного эффекта этого соединения на модели глутамат-индуцированных судорог не ясен).

Однако среди дипептидов имеются соединения, которые при в/ж введении не обладали судорожным действием в дозах вплоть до 0.5 мкмоль: N-Ac-L-Phe-L-Glu, N-Ac-L-Tyr-L-Glu и N-Ac-L-Tyr(OBzl)-L-Glu. Поэтому было исследовано влияние перечисленных соединений на судороги, вызываемые L-глутаматом при одновременном в/ж введении с конвульсантом. Противосудорожную активность оценивали по способности тестируемых соединений увеличивать значение ED₅₀ конвульсантам. Сравнение результатов, полученных для испытуемых соединений с таковыми для антагонистов ВАР γ-DGG и ДЭЭГ показывает, что наиболее активным является N-Ac-L-Phe-L-Glu. Влияние же двух других дипептидов было незначительным.

Для установления спектра противосудорожного действия изучаемых веществ, было проведено исследование влияния этих трех дипептидов на судороги, вызываемые NMDLA и каинатом, а также на коразоловые судороги, не связанные с активацией рецепторов ВАК. Только дипептид N-Ac-L-Phe-L-Glu обладал защитным действием против NMDLA-индуцируемых судорог, не уступая по силе эффекта γ -DGG. Однако оба эти соединения заметно уступают AP7. Результаты изучения спектра противосудорожного действия этих дипептидов против каинатных и коразоловых судорог показали, что на этих моделях они не проявили противосудорожной активности [Gagyaev et al., 1991].

Следовательно, утяжеление молекулы дипептида за счет введения фенильного радикала (N-Ac-L-Phe-L-Glu) приводит к появлению слабого, но селективного NMDA-антагонистического действия. Дальнейшее увеличение этого радикала введением гидроксила (N-Ac-L-Tyr-L-Glu) или бензильной группы (N-Ac-L-Tyr(OBzl)-L-Glu) приводит к ослаблению блокирующих свойств.

Таким образом, из анализа результатов исследования зависимости активности дипептидов-аналогов NAAG от химической структуры видно, что в этом ряду существуют соединения, проявляющие агонистические свойства в отношении ВАКергической передачи.

Среди лигандов рецепторов ВАК известны соединения пептидной природы с N-концевыми глутаминовой, аспарагиновой и каиновой кислотами. Они способны ингибировать некоторые эффекты ВАК и действовать как антиконвульсанты. Однако в молекулах этих соединений конечная аминокислота не блокирована и заряжена в биологических условиях положительно. Свободная аминокислота в этих пептидах принадлежит α -аминокислотному фрагменту молекулы, а пептидная связь во всех антагонистах образована омега-карбоксильной группой соответствующей кислой аминокислоты.

В синтезированной нами серии дипептидов наиболее активны соединения с блокированной аминокислотой. Блокирование ДЭЭГ их действия, как уже отмечалось выше, свидетельствует о том, что активность связана с рецепторами ВАК. Следовательно, ВАКергическими могут являться не только соединения с одним положительным и двумя отрицательными зарядами, но и соединения, не имеющие в молекуле положительно заряженной группы (в большинстве дипептидов только две карбоксильные группы, и лишь в β -NAAG их три).

Среди дипептидов, производных дикарбоновых аминокислот по ω -карбоксильной группе, не обнаружено веществ, обладающих возбуждающим действием на ЦНС. В противоположность этому, среди дипептидов с C-концевыми аспарагиновой и глутаминовой кислотами существуют соединения, обладающие "глутаматоподобным" действием на ЦНС. В отличие от известных антагонистов ВАК, для подобных "глутаматомиметиков" предпочтительнее блокированный N-конец (причем оптимальна ацетильная группа). Однако и в том, и в другом случае наиболее активны соединения с минимальной длиной цепочки и D-конфигурацией хирального центра (γ -DGG, γ -D-GAMS, γ -D-GAMP и N-Ac-Gly-D-Glu).

Однако среди дипептидов общей формулы N-Ac-X-Glu (или Asp) существуют не только соединения, активирующие ВАКергическую систему в ЦНС, но и соединения, способные блокировать судорожное действие некоторых ВАК. Такое "обращение" действия вызывается введением в N-концевую аминокислоту неполярного липофильного остатка, т.е. среди дипептидов с C-концевыми аспарагиновой или глутаминовой кислотами наблюдается плавное изменение активности от миметической до литической по мере увеличения размера молекулы и ее липофильности.

Таким образом, данные по биологической активности дипептидов с С-концевыми ВАК указывают, что способностью взаимодействовать с ВАКергической системой обладают соединения, содержащие в молекуле только кислотные группы. При этом свободная аминогруппа заменяется на полярную амидную группу [Piotrovsky et al., 1991; Garyaev et al., 1991].

8.3. N-ацилпроизводные глутаминовой и аспарагиновой кислот

Существенную роль в проявлении ВАКергической активности исследованных дипептидов играет полярная амидная группа. Однако, оставаясь в рамках соединений пептидной природы, невозможно провести детальное исследование влияния ее окружения на биологическую активность. Именно поэтому нами был предпринят синтез и изучение биологических свойств ряда N-ацилпроизводных аспарагиновой и глутаминовой кислот.

N-ацилпроизводные аспарагиновой и глутаминовой кислот, перечисленные в табл. 8.3, при в/ж введении мышам вызывали судороги. Как и в случае дипептидных производных, судорожные припадки развивались по следующей схеме: после некоторого латентного периода развивалось состояние резкого двигательного возбуждения ("дикий бег"), затем миоклонические или генерализованные клонико-тонические судороги. Следует отметить, что даже в больших дозах эти соединения не вызывали тонической экстензии, завершающейся гибелью животных. Это связано, видимо, с невысокой судорожной активностью исследуемых соединений. Лишь адамантановое производное (4-AdOC₆H₄OCH₂-L-Glu) по активности было сравнимо с L-глутаматом, активность других веществ была значительно ниже.

Судорожное действие исследуемых соединений блокировалось предварительным в/ж введением ДЭЭГ и не блокировалось в/ж введением γ -DGG.

Хотя введение ацильного заместителя к атому азота аминогруппы кислых аминокислот и ослабляет их судорожную активность, из данных, приведенных в табл. 8.10, можно сделать определенные выводы о структурных параметрах молекул, определяющих силу судорожного действия соединений данного ряда. При сравнении активностей производного 3-фенил-3-оксипропионовой кислоты [R=PhCO(CH₂)₂] и 3-фенилпропионовой кислоты [R=Ph(CH₂)₃] видно, что замена в ацильном остатке полярной группы CO неполярной метиленовой группой CH₂ приводит к резкому падению активности. Эти данные позволяют предположить необходимость сочетания в заместителе при атоме азота аминогруппы липофильных и полярных групп в непосредственной близости друг к другу. Сравнение активностей близких по структуре соединений PhOCH₂-L-Glu и PhCH₂CO-L-Glu и соединений, содержащих чисто липофильные радикалы (2-нафтил и Ph₂CH), также говорит в пользу этого предположения. В то же время сочетание полярной группы с высоколипофильным фрагментом (4-AdOC₆H₄OCH₂) обеспечивает этому соединению достаточно высокую возбуждающую активность.

Зависимость судорожной активности соединений данного ряда от степени полярности группировки, расположенной около ароматического радикала, отчетливо видна и из сравнения активностей производных дифенилуксусных кислот. Самое полярное соединение, производное бензиловой кислоты [R=Ph₂C(OH)], является и наиболее активным. Замещение атома водорода гидроксильной группы этильным радикалом [R=Ph₂C(OEt)] приводит к слабому снижению активности, а замена всей полярной группы на атом водорода приводит

к производному дифенилуксусной кислоты $[R=Ph_2CH]$, которое возбуждающей активностью не обладает.

Таблица 8.3. Судорожная активность N-ацилпроизводных глутаминовой и аспарагиновой кислот $R-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_n-COOH$ (в/ж, мыши).

R	n	ED ₅₀ (мкмоль)	Относительная активность
L-Glu		0.034 (0.022-0.053)	100.0
4-AdOC ₆ H ₄ OCH ₂	2	0.030 (0.025-0.036)*	113.0 (72.9-175.2)
Ph	1	0.090 (0.051-0.151)*	37.8 (24.4- 58.6)
Bzl	2	0.090 (0.064-0.172)*	37.8 (24.4- 58.6)
Bzl	1	0.110 (0.071-0.171)*	30.9 (19.9- 47.9)
PhCO(CH ₂) ₂	2	0.140 (0.096-0.204)*	24.3 (15.7- 37.7)
Ph ₂ C(OH)	2	0.144 (0.095-0.227)*	23.6 (15.2- 36.6)
Ph ₂ C(OEt)	2	0.208 (0.161-0.205)*	16.3 (13.6- 16.6)
PhOCH ₂	2	0.213 (0.159-0.288)*	16.0 (10.3- 24.8)
Ph	2	0.270 (0.185-0.394)*	12.6 (8.1- 19.5)
1-нафтил	2	0.300 (0.188-0.479)*	11.3 (7.3- 17.5)
Ph	2	0.320 (0.198-0.505)*	10.6 (6.8- 16.4)
PhCH ₂ O	1	0.370 (0.234-0.553)*	9.2 (5.9- 14.3)
PhCH ₂ O	2	0.370 (0.234-0.553)*	9.2 (5.9- 14.3)
Ph(CH ₂) ₃	2	0.390 (0.233-0.596)*	8.7 (5.6- 13.5)
2-нафтил	2	0.450 (0.266-0.698)*	7.6 (4.9- 11.8)
Ph ₂ CH	2	свыше 0.500	

* $p < 0.05$

Возбуждающее действие этого ряда соединений, так же как и дипептидов - аналогов NAAG, блокируется ДЭЭГ, что позволяет сделать вывод об участии AMPA рецепторов в развитии их эффекта.

Таким образом, N-ацилированные производные L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот сохраняют способность к взаимодействию с ВАКергической системой в ЦНС млекопитающих. Величина эффекта зависит от структуры ацильного радикала, при этом оптимальным вариантом является наличие полярного атома (или группы) около липофильного фрагмента, а вся эта группировка должна быть отделена от амидной группы одним атомом углерода. Вероятно, при взаимодействии подобных соединений с рецептором две карбоксильные группы связываются с катионными пунктами рецептора, а с третьим, анионным, пунктом образуется полярная неионная связь.

8.4. N-Фталамоил-L-глутаминовая кислота - "суперкислый" агонист NMDA рецепторов

Среди N-ацилпроизводных глутаминовой кислоты наибольший интерес представляет N-фталамоил-L-глутаминовая кислота (PhGA). Появление в ацильном остатке карбоксильной группы придает этому соединению новые свойства: в опытах *in vivo* она предупреждает судороги, вызываемые ВАК. Анализ противосудорожного действия PhGA показал, что она дозозависимо подавляет судороги, вызываемые NMDLA, и превосходит по силе действия γ -DGG. Против каинат-индуцированных судорог PhGA действует слабо и только в максимальных дозах (1.0 мкмоль) [Гаряев и др., 1990].

При изучении действия PhGA на пирамидальные нейроны гиппокампа крыс было обнаружено, что она является избирательным агонистом NMDA рецепторов. Это следует из того, что а) ответ на ее действие появлялся только в присутствии глицина, селективного модулятора NMDA рецепторов; б) обратный потенциал индуцируемых ею токов был идентичен таковому для аспартат-индуцируемых токов; в) вызванный ею ответ избирательно блокировался ионами Mg^{2+} , блокатором ионных каналов NMDA рецепторов, конкурентным (D-AP5) и неконкурентным (кинуренатом) NMDA антагонистами; г) наблюдалась полная перекрестная десенситизация ответов на аспартат и PhGA. Однако максимальный ответ, вызываемый этим соединением, значительно меньше, чем ответы на аспартат и NMDA [Kiskin et al., 1991].

Влияние PhGA на связывание 3H -L-Glu с синаптическими мембранами гиппокампа человека было изучено в сравнении с NMDA. Константы ингибирования связывания 3H -L-Glu для NMDA и PhGA оказались равны 19 и 13 мкМ, соответственно. Добавление в инкубационную среду глицина не влияло на параметры связывания 3H -L-Глу, но усиливало ингибирующее действие NMDA и PhGA, что также свидетельствует об избирательности взаимодействия этого соединения с NMDA рецепторами [Корешонков и др. 1992].

Фармакологический анализ действия PhGA при в/ж введении мышам показал, что она обладает выраженным противосудорожным действием, дозозависимо подавляя судороги, вызываемые NMDLA. Величина ED₅₀ судорожного действия этого конвульсанта поднимается более чем на порядок (табл. 8.4), что в два раза превосходит эффект эквимолярных доз γ -DGG. Однако только в максимальных дозах (1.0 мкмоль) PhGA подавляет каинатные судороги (табл. 8.5).

Из сравнения данных биологического действия PhGA *in vivo* и *in vitro* можно сделать вывод, что она является частичным агонистом. "Внутренняя активность" этого соединения невелика, поэтому *in vivo* при введении его максимально возможной дозы (1 мкмоль) судорожный ответ не возникает. Обладая практически таким же сродством к рецептору, что и NMDA, трикислота PhGA в экспериментах *in vivo* способна блокировать ее действие, так как концентрация последней в этих опытах на три порядка ниже.

В отличие от большинства других агонистов рецепторов ВАК, молекула PhGA не содержит амино-, но зато содержит три карбоксильные группы. Необходимость ароматической карбоксильной группы для проявления NMDA агонистического действия следует из того, что его дезкарбоксианалог, N-бензоил-L-глутаминовая кислота (BzlGlu), таким действием не обладает. Поэтому PhGA была нами названа "суперкислым" агонистом NMDA типа [Kiskin et al., 1991].

Таблица 8.4. Сравнение противосудорожной активности PhGA и γ -DGG на модели NMDLA-индуцированных судорог при одновременном введении (в/ж, мыши).

Соединение	ED ₅₀ (мкмоль)	Относительная активность
NMDLA	0.0017(0.0010-0.0026)	1.00
NMDLA + γ -DGG (1.00 мкмоль)	0.0120 (0.0087-0.0165)	7.05 (4.05-12.20)
NMDLA + γ -DGG (0.25 мкмоль)	0.0034 (0.0020-0.0058)	2.02 (1.00- 4.06)
NMDLA + PhGA(1.00 мкмоль)	0.0223 (0.0176-0.0280)	13.01 (7.83-21.52)
NMDLA + PhGA(0.25 мкмоль)	0.0084(0.0060-0.0117)*	4.29 (2.79- 8.65)

* $p < 0.05$

Таблица 8.5. Сравнение противосудорожной активности PhGA и γ -DGG на модели каинат-индуцированных судорог при одновременном введении (в/ж, мыши).

Соединение	ED ₅₀ (мкмоль)	Относительная активность
Каинат	0.0003(0.0002-0.0005)	1.00
Каинат + γ -DGG (1.00 мкмоль)	0.0007 (0.0004-0.0017)*	2.39 (1.19-4.78)
Каинат + γ -DGG (0.50 мкмоль)	0.0003 (0.0002-0.0004)	1.09 (0.66-1.79)
Каинат + PhGA (1.00 мкмоль)	0.0007 (0.0004-0.0011)*	2.40 (1.31-4.36)
Каинат + PhGA (0.25 мкмоль)	0.0003 (0.0002-0.0004)	1.00 (0.52-1.90)

* $p < 0.05$

Для выяснения зависимости биологической активности от химической структуры в ряду "суперкислых" NMDA агонистов нами был синтезирован ряд аналогов PhGA и проведено исследование их биологической активности методом радиолигандного связывания. При этом было установлено, что изменение строения хирального центра молекулы PhGA резко ухудшает способность этой молекулы ингибировать специфическое связывание 3H-L-Глу. В концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М эффект практически не наблюдается. Сдвиг ароматической карбоксильной группы по циклу (мета- и пара-аналоги isoPhGA и terePhGA, производные изо- и терефталевых кислот) также приводит к снижению ингибирующей активности [Корешонков и др., 1995b].

8.5. Производные имидазолдикарбоновой кислоты

При исследовании действия трех соединений этого ряда, а именно 1-метил-, 1-этил- и 1-бензилимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты было установлено, что они при в/ж введении мышам в дозах более 25 мкг вызывают судороги. Однако в субсудорожных дозах эти соединения способны, причем с различной избирательностью, блокировать судорожные эффекты разных ВАК. Так, 1-метилпроизводное избирательно блокирует только судороги, вызванные NMDA и хинолиновой кислотой. При увеличении радикала избирательность действия исчезает и два других соединения блокируют судорожное действие широкого набора ВАК (NMDA, хинолиновой, глутаминовой, аспарагиновой и каиновой кислот) [Рыжов и др., 1988].

Таким образом, в производных имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты ВАКергическим фармакофором служит дикарбоксильный фрагмент гетероцикла, т.е. эти соединения можно рассматривать как аналоги хинолиновой кислоты.

содержащие пятичленный азотистый гетероцикл. Именно поэтому полученные соединения действуют эффективнее на NMDA тип рецепторов ВАР, а их способность в опытах *in vivo* проявлять, в зависимости от дозы, судорожные и противосудорожные свойства свидетельствует о том, что N-алкилпроизводные имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты являются частичными агонистами.

Формально и хинолиновая, и имидазолдикарбоновая кислоты содержат в молекуле аминодикарбоксильный фрагмент, и поэтому можно считать, что их структура соответствует общей схеме строения лигандов рецепторов ВАР. Однако, в отличие от других лигандов, в этих соединениях атом азота входит в состав гетероцикла и его основность сильно понижена в результате электроноакцепторного влияния расположенных рядом двух карбоксильных групп. Поэтому при физиологических значениях pH протонирование происходит не будет. Результаты исследования фармакологической активности N-алкилпроизводных имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты подтвердили сделанный ранее вывод о том, что связывание атома азота аминогруппы с активным центром рецептора ВАР не обязательно осуществляется ионной связью. Следовательно, ВАРгический фармакофор может быть представлен не только тремя ионогенными группами (т.е. тремя целочисленными зарядами), а двумя электронодонорными и одной электроноакцепторной группами.

8.6. Моделирование глутамат-связывающих сайтов рецепторов NMDA и AMPA типов

Исследования последних лет показали, что ионотропные рецепторы ВАР млекопитающих представляют собой сложные надмолекулярные комплексы, состоящие из нескольких субъединиц каждый. Установлено 16 генов, кодирующих эти субъединицы [Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Hollmann, Heinemann, 1994]. Субъединицы NMDAR1 и NMDAR2A-D образуют рекомбинантный NMDA рецептор, субъединицы GluR1-R4 - AMPA рецептор, а субъединицы GluR5-R7 и KA-1/KA-2 образуют каинатный рецептор. Подробнее о молекулярно-биологических исследованиях рецепторов ВАР см. [Schoepfer et al., 1994; Bochet et al., 1993]. В нескольких работах на основании данных по первичной структуре различных субъединиц рецепторов ВАР предлагаются их трехмерные модели, включающие в себя трансмембранные, каналобразующие и узнающие участки [Bennett et al., 1995; Stern-Bach et al., 1994; Wo, Oswald, 1994; Roche et al., 1994].

Однако о структуре самих узнающих сайтов известно не много. В работе Stern-Bach et al. [1994] идентифицированы два сегмента, содержащие около 150 аминокислотных остатков каждый и определяющие агонист-связывающие свойства. Аминокислотная последовательность этих двух сегментов похожа на аминокислотную последовательность некоторых периплазматических бактериальных белков, связывающих аминокислоты и входящих в состав систем их высокоаффинного транспорта [O'Hara et al., 1993].

Существование нескольких типов рецепторов ВАР свидетельствует о различии в топографии агонист-связывающих сайтов этих рецепторов. К сожалению, ее прямое определение по данным рентгено-структурного анализа рецепторного комплекса в отсутствии и присутствии агониста на сегодняшний день невозможно. Поэтому эту задачу приходится решать косвенными методами, например, построением трехмерной модели фармакофора связывающего сайта по биологически активной конформации лиганда, комплементарной данному сайту. Под фармакофором в данном контексте мы понимаем определенным образом расположенные в пространстве функциональные группы молекулы, обеспечивающие ее взаимодействие с рецептором. Строение самого рецептора, как

мембранного белкового комплекса, и структура его узнающего сайта, как набора боковых групп аминокислотных остатков полипептидной цепи, упорядоченно ориентированных в пространстве, остаются за рамками подобных моделей. Однако косвенные методы позволяют определять основные геометрические параметры связывающего сайта, сделать определенные выводы о его окружении (наличие липофильных или гидрофильных областей) и выделить основные параметры молекулы лиганда, определяющие избирательность его действия, что является необходимым для планирования синтеза новых избирательно действующих на данный рецептор соединений.

Для построения таких моделей целесообразно использовать теоретический конформационный анализ (метод молекулярной механики). С помощью этого метода можно определить биологически активные конформации молекул наиболее селективных агонистов.

В большинстве случаев молекулы нейромедиаторов и их синтетические аналоги представляют собой достаточно гибкие молекулы, обладающие большим числом степеней конформационной свободы, и существуют в нескольких конформациях. Поэтому встает проблема выбора биологически активных конформаций, комплементарных связывающему сайту рецептора, из достаточно большого набора реально существующих. В общем случае эта задача решается определением геометрических параметров максимального числа конформаций нескольких молекул, обладающих данным типом активности, и выбора из них одинаковых для всех исследованных молекул. Однако в ряде работ [см. например Говырин, Жоров, 1984] было показано, что обычно биологически активной конформацией данного лиганда рецепторов является его наиболее энергетически выгодная (с наименьшей энергией), наиболее стабильная.

Этот факт, на наш взгляд, легко можно объяснить в рамках существующих на сегодня теорий рецепторов [см. Сергеев, Шимановский, 1987]. В классической теории рецепторов принимается, что агонист вызывает конформационные изменения рецептора, то есть из двух взаимодействующих субстратов лабильным, изменяющимся является белок рецептора, молекула лиганда - жесткой, изменяющей. Следовательно, молекула лиганда должна существовать в биологически активной конформации еще до взаимодействия с рецептором, а это значит, что эта конформация относится к числу наиболее стабильных конформаций (если не самая стабильная).

В рамках аллостерической теории (называемой иногда "two-state model") рецептор рассматривается как равновесное сосуществование двух конформационных состояний - активного и неактивного. Ключевым пунктом этой теории является то, что рецептор может существовать в активном состоянии, то есть в состоянии, которое вызывает биологический ответ, и в отсутствие агониста [Leff, 1995]. Агонисты, обладая сродством к рецептору в активном состоянии, связываются с ним и смещают тем самым равновесие в его сторону. Антагонисты же, наоборот, обладают большим сродством к неактивному состоянию. (Правда, с появлением понятия инверсных агонистов, в настоящее время считается, что аффинностью к неактивному состоянию обладают именно они, а конкурентные антагонисты обладают одинаковым сродством к обоим состояниям [Leff, 1995].) В рамках этой теории лиганд рассматривается как жесткая фиксирующая (а не изменяющая) часть лиганд-рецепторного комплекса. И, следовательно, биологически активная конформация лиганда должна быть опять-таки из набора наиболее стабильных.

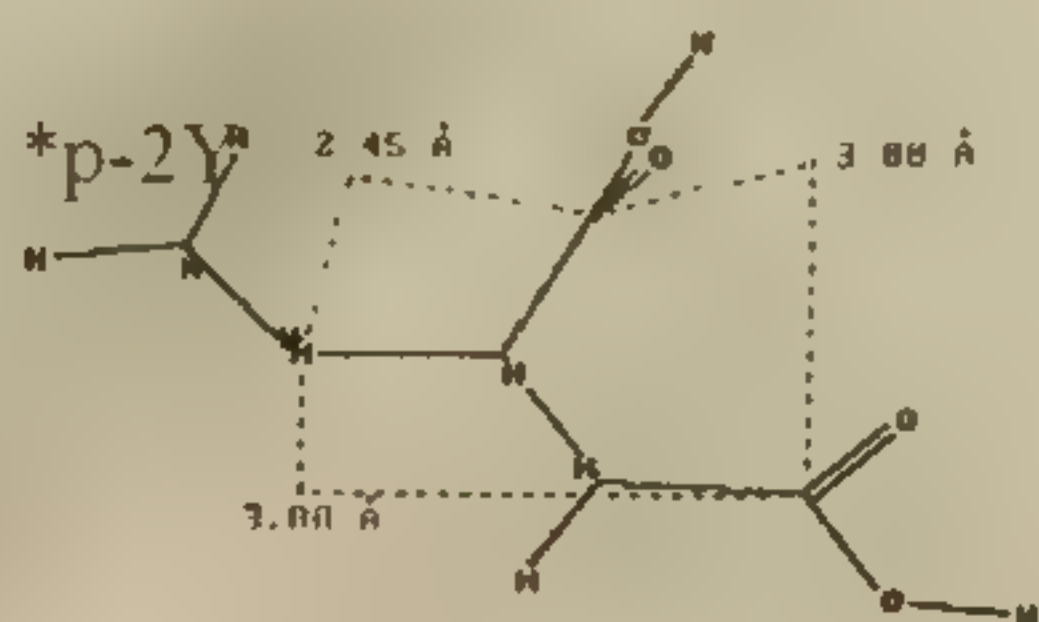
Исследование ВАРгической активности пептидов - аналогов NAAAG, N-ацилпроизводных аспарагиновой и глутаминовой кислот и N-алкилпроизводных имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты показали, что для взаимодействия с рецепторами ВАР достаточно двух ионогенных кислотных групп, тогда как атом азота может быть и слабоосновным. Это свидетельствует о том, что между лигандом и рецептором ВАР не обязательно образуются только ионные связи. Возможно, как уже постулировалось и ранее, и образование других типов связей неионизированными молекулами.

Поэтому в качестве основных геометрических параметров лиганда можно выбрать расстояния между центрами фармакофорных групп (атомы углерода карбоксильных групп, атом азота аминокруппы и т.п.) [Bigge et al., 1992; Dorville et al., 1992; Krogsgaard-Larsen et al., 1985]. Расстояние между амино- и карбоксильной группами в α -аминокислотной группировке у всех α -аминокислот равно 2.50 ± 0.25 А. Поэтому главными параметрами конформеров лигандов рецепторов ВАР будут расстояния между атомами азота α -аминогруппы и атомом углерода ω -карбоксильной группы ($N-C_{\omega}$) и атомами углерода α - и ω -карбоксильных групп ($C_{\alpha}-C_{\omega}$).

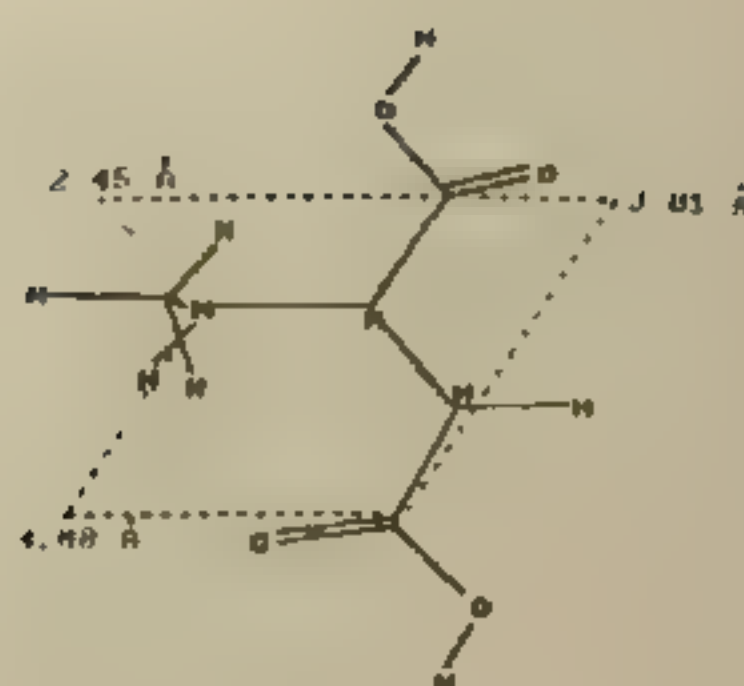
Так как при таком подходе рассматривается образование не только ионных, но и других полярных связей, вполне допустимо рассчитывать конформации молекул кислых аминокислот в незаряженной форме, то есть с недиссоциированными ионогенными группами. Безусловно, изменение заряда молекулы и изменение Среды приводят к изменению наиболее стабильных конформаций. Однако в конкретных случаях молекул NMDA и AMPA эти изменения оказываются несущественными. Как показывают данные конформационных расчетов, выполненных в поле MM2 [Буркерт, Эллингджер, 1986, Кларк, 1990] с помощью программы PC MODEL 3.2, замена в них незаряженных ионогенных групп на заряженные и использование различных величин диэлектрической проницаемости среды (от 1.5 до 78.3), хотя и приводят к изменению энергий наиболее стабильных конформаций, однако не изменяют такие их геометрические параметры, как $N-C_{\omega}$ и $C_{\alpha}-C_{\omega}$.

Трехмерная модель фармакофора глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора. При построении трехмерной модели фармакофора глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора необходимо учитывать, что изучение связывания таких NMDA антагонистов, как 2-амино- ω -фосфонокарбоновые кислоты, исследования роли природы ω -кислотной группы привели к выводу о наличии особого пункта для связывания ω -фосфоновой группы. Таким образом, в глутамат-связывающем сайте NMDA рецептора существуют четыре пункта: N и C1 пункты для связывания α -аминокислотной группировки и два пункта связывания γ - и ω -кислотных групп: C2 и C3 пункты для агонистов и антагонистов, соответственно [Watkins, Olvermann, 1988; Fagg et al., 1988].

Оценка набора наиболее стабильных конформаций молекулы NMDA по выбраным нами ранее параметрам, а именно расстояния $N-C_{\beta}$ и $C_{\alpha}-C_{\beta}$ показывает, что можно выделить две группы конформаций, отличающихся ориентацией β -карбоксильной группы относительно α -аминокислотной группировки (рис.8.1). В первой группе (NMDA1) расстояния $N-C_{\beta}$ и $C_{\alpha}-C_{\beta}$ равны $2.95-3.05$ А и $3.80-3.90$ А, соответственно, а во второй (NMDA2) - $3.80-3.85$ А и $3.00-3.10$ А, соответственно. При этом для незаряженной молекулы в вакууме разница энергий наиболее стабильных конформаций (NMDA1) и (NMDA2) составляет 0.25



конформация (NMDA1)



конформация (NMDA2)

Рис. 8.1. Наиболее энергетически выгодные конформации молекулы NMDA

ккал/моль, а для заряженной молекулы в воде - 0.85 ккал/моль.

Для выбора биологически активной конформации нами были проведены расчеты для молекулы (1S,3R)-1-аминоциклобутан-1,3-дикарбоновой кислоты (ACBD), сильного и избирательного лиганда NMDA рецепторов с жесткой молекулой, существующей только в одной конформации. Эта конформация молекулы ACBD совпала с конформацией (NMDA1) (рис. 8.2).

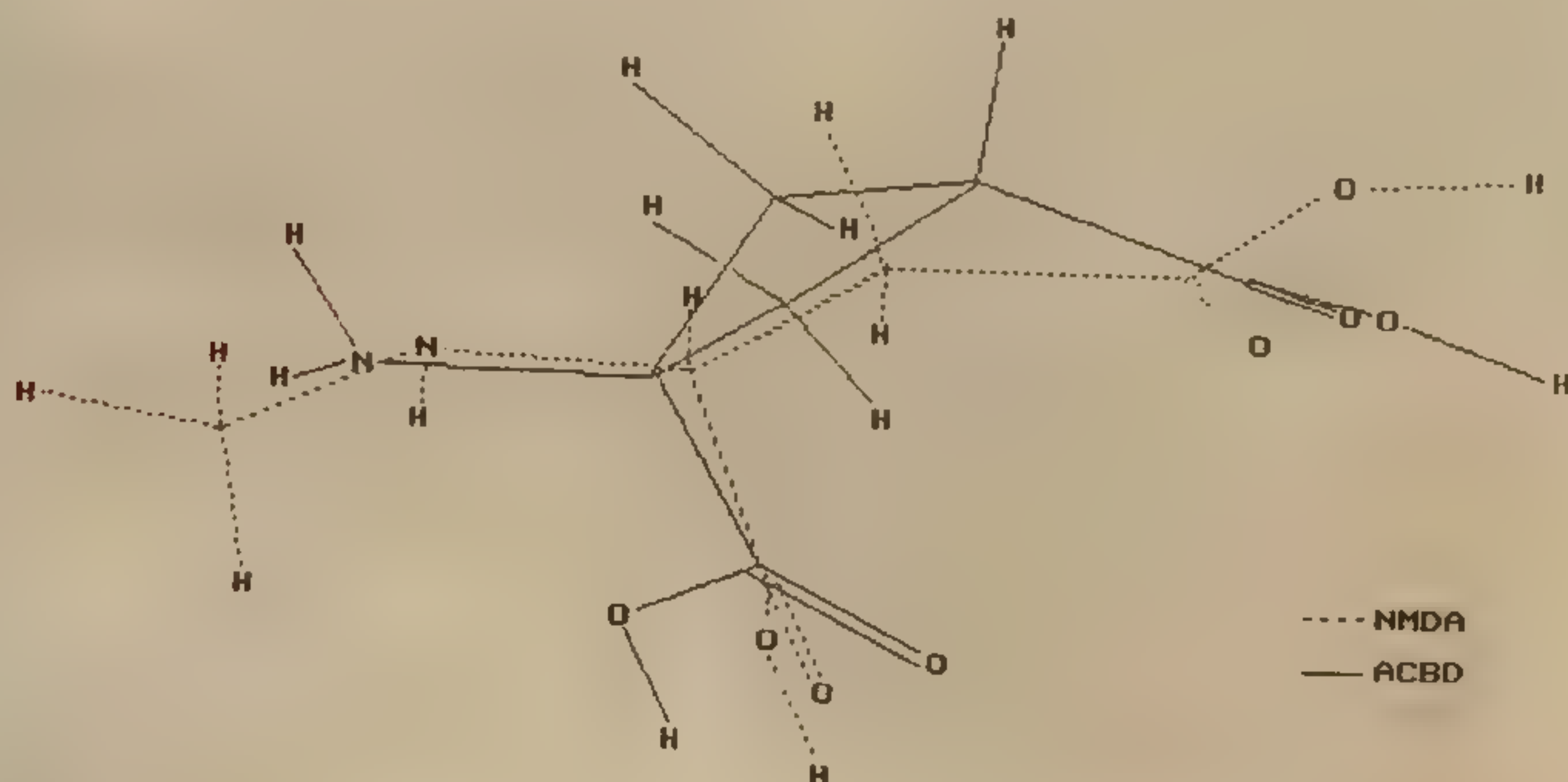


Рис. 8.2. Сравнение наиболее стабильных конформаций молекул NMDA и ACBD.

Следовательно, можно сделать вывод, что биологически активной конформацией NMDA является наиболее стабильная конформация (NMDA1).

По объемным моделям биологически активных конформаций молекул NMDA и других избирательных агонистов NMDA рецепторов [ACBD, транс-пиперидин-2,3-дикарбоновой, (1R,3S)-1-аминоциклопентан-1,3-дикарбоновой (ACPD) и

некоторых других] можно определить геометрические параметры агонистического фармакофора глутамат-связывающего сайта NMDA рецепторов млекопитающих. С учетом размеров атомов кислорода и ван-дер-ваальсовых радиусов место связывания характеризуется следующими параметрами: максимальная длина - 7.3 А, максимальная ширина - 6.3 А, максимальная высота - 5.0 А. Вниз от плоскости N-C α -C β границы молекул агонистов выступают на расстояние не более 2.0 А, что соответствует размерам карбоксильной группы. Вверх от этой плоскости в исследованной серии агонистов выступ достигает 3.0 А. Это свидетельствует об отсутствии в этой области стерических препятствий. Другими словами, активный центр рецептора представляет собой открытую сверху впадину на постсинаптической мембране. Причем около N пункта она имеет расширение (липофильную область), куда должна помещаться метильная группа. Эта липофильная область не очень велика по размерам, так как увеличение размера заместителя у атома азота аминокислоты приводит к резкому падению сродства к рецептору.

Для построения полной модели фармакофора глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора, с учетом места связывания антагонистов, были использованы данные работы [Dorville et al., 1992], по которым биологически активная конформация антагонистов ряда 2-амино- ω -фосфонокарбоновых кислот характеризуется следующими значениями расстояний между центрами фармакофорных групп N-C, N-P и C-P: 2.44, 5.89 и 6.66 А, соответственно.

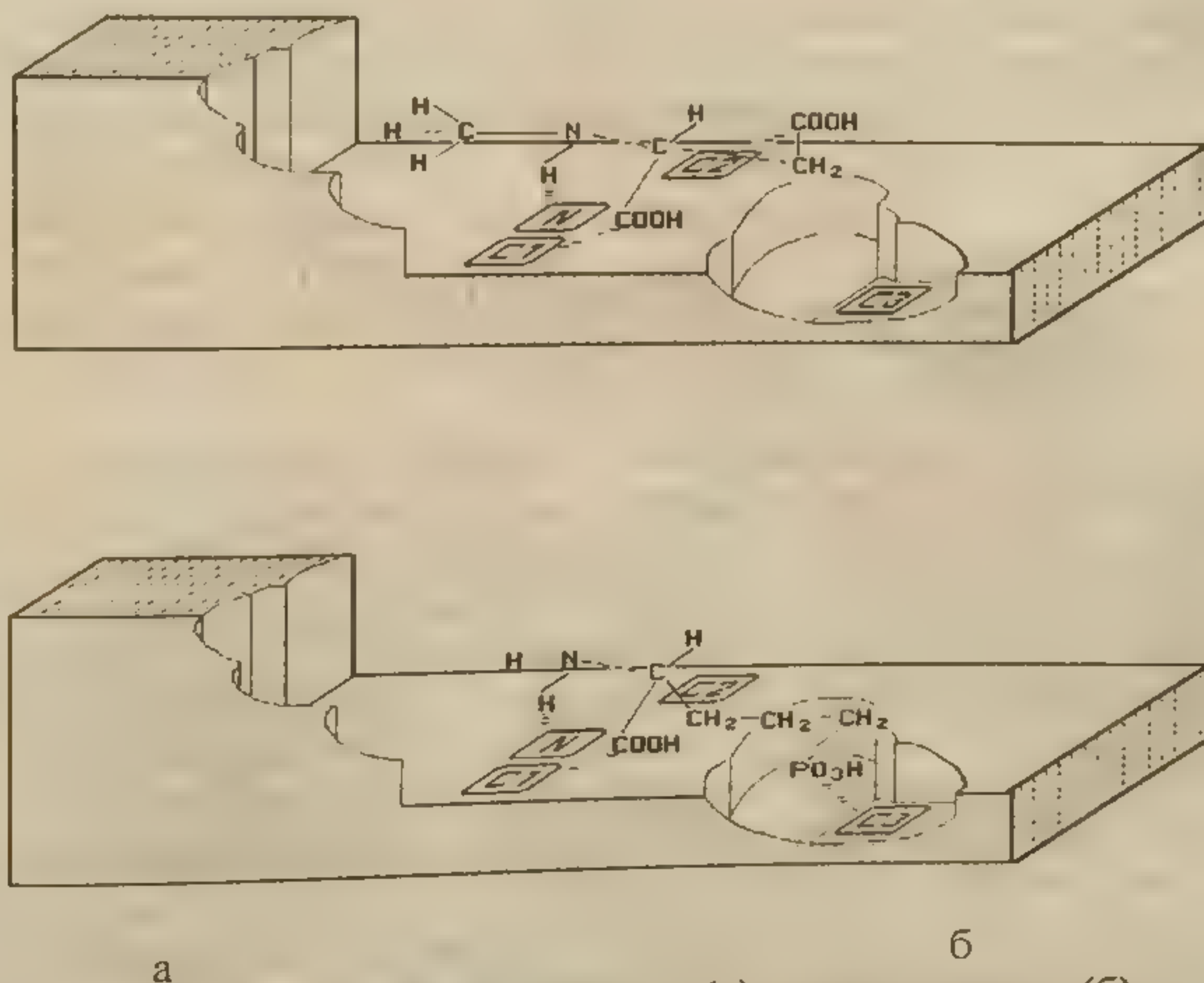


Рис. 8.3. Ориентация молекул агонистов (а) и антагонистов (б) на глутамат-связывающем сайте NMDA рецептора.

Совмещение биологически активных конформаций молекул агонистов и антагонистов позволило построить трехмерную модель глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора, включающего в себя четыре связывающих пункта: N, C1, C2 и C3. Агонисты связываются с пунктами N, C1 и C2, а антагонисты - с пунктами N, C1 и C3 (рис. 8.3).

Предлагаемая схема строения глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора построена на основе структур агонистов классического строения, а именно кислот аминокислот. Отметим при этом, что одним из основных стерических параметров этих молекул является D(R) конфигурация хирального центра.

Однако среди агонистов NMDA рецепторов известны молекулы и неклассического строения, а именно "суперкислый" агонист PhGA. Одним из существенных отличий этого агониста от известных ранее является то, что NMDA агонистической активностью обладает L-изомер, тогда как D-изомер полностью не активен. Исследования роли карбоксильных групп в проявлении активности показали, что необходимы все три карбоксильные группы, удаление любой из них приводит к неактивному соединению [Корешонков и др., 1995; Kiskin et al., 1991].

Для выяснения вопроса об ориентации молекулы PhGA на глутамат-связывающем сайте NMDA рецептора с помощью различных пакетов программ (PC MODEL 3.2 и SYBYL) нами было проведено сравнение наиболее энергетически выгодных конформаций молекул NMDA, D-AP5 и PhGA совмещением трех центральных атомов фармакофорных групп (атомов азота обеих молекул и попарно, в различных сочетаниях, атомов углерода карбоксильных групп).

Было установлено, что при совмещении молекул NMDA и PhGA из шести возможных комбинаций наиболее выгодными являются только три. Одно из них (совмещение атомов N-C α -C β молекулы NMDA с атомами N-C α -C γ молекулы PhGA, соответственно) не имеет биологического смысла, так как в этом случае из взаимодействия с рецептором исключается ароматическая карбоксильная группа. Однако ее наличие необходимо для проявления активности [Kiskin et al., 1991]. Два других варианта совмещения - атомы N-C α -C β молекулы NMDA с атомами N-C α -C ar молекулы PhGA, соответственно (N-N, C α -C α , C β -C ar), и атомы N-C α -C β NMDA с N-C ar -C α PhGA, соответственно (N-N, C α -C ar , C β -C α).

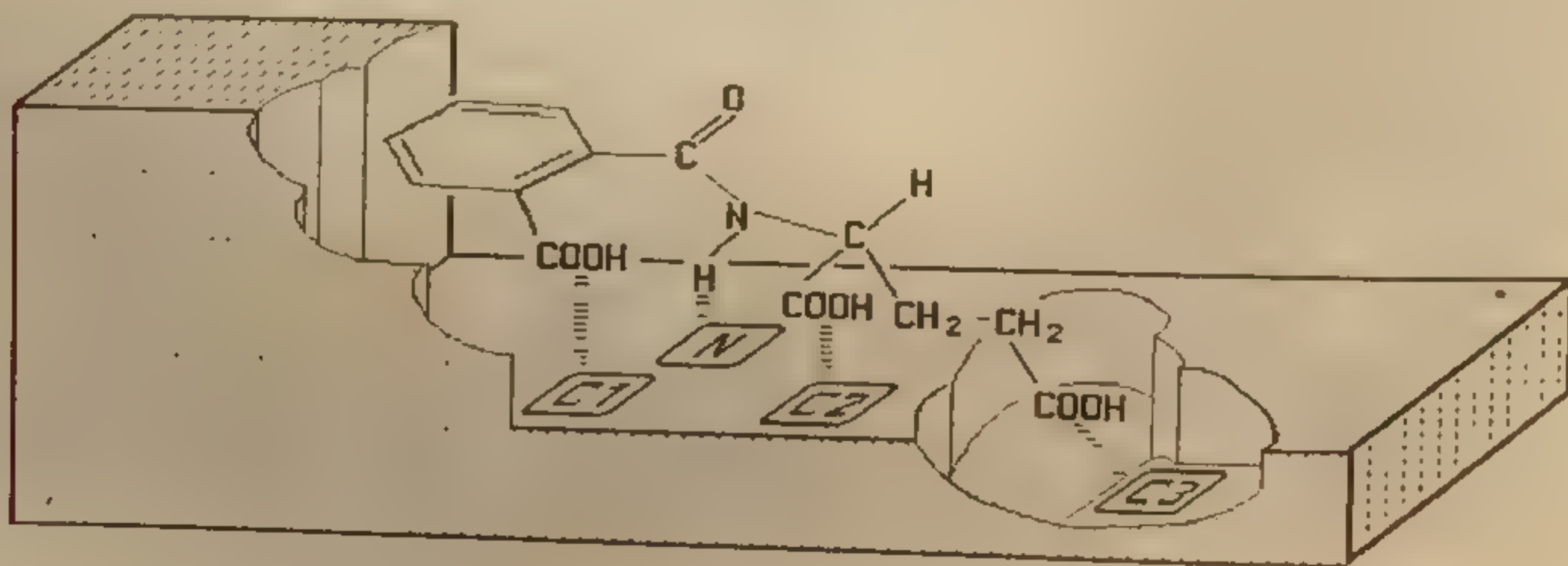


Рис. 8.4. Ориентация молекулы PhGA, "суперкислого" агониста NMDA типа, на глутамат-связывающем сайте NMDA рецептора

Выбор между ними позволяет сделать совмещение молекул PhGA и D-AP5. Для этих молекул существует лишь один оптимальный вариант совмещения атомов N-C α -P молекулы D-AP5 с атомами N-C ar -C γ молекулы PhGA.

D-изомер PhGA (D-PhGA) сродством к NMDA рецептору не обладает [Корешонков и др., 1995]. Поэтому эта молекула была использована для проверки полученных результатов. При совмещении D-изомера PhGA с молекулами NMDA и D-AP5 оказалось, что группа $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ уходит вверх от плоскости N, C1 и C2 пункта, и не может образовывать связь с пунктом C3.

Следовательно, активность молекулы PhGA связана с ее способностью образовывать связи со всеми четырьмя пунктами глутамат-связывающего сайта NMDA рецептора: ароматической COOH - с C1 пунктом рецептора, атомом N амидной группы (или всей группой CONH) - с N-пунктом, $\alpha\text{-COOH}$ - с C2 пунктом, и $\gamma\text{-COOH}$ - с C3 пунктом.

На предлагаемой схеме отчетливо видно, почему в случае молекулы PhGA активен L-изомер. Ароматическая карбоксильная группа находится в амидном остатке и в результате псевдоинверсии хирального центра оказывается в той же области пространства, где у D-аминокислот располагается α -карбоксильная группа.

Таким образом, молекулы "суперкислых" агонистов NMDA рецепторов способны образовывать четыре связи с глутамат-связывающим сайтом. Очень важным при этом является тот факт, что несмотря на взаимодействие с C3 (антагонистическим) пунктом, PhGA проявляет агонистические свойства. Отличие ее связывания с активным центром рецептора от связывания антагонистов лишь в том, что она взаимодействует еще и с C2 пунктом рецептора. Отсюда очевидно, что именно этот пункт определяет тип активности лиганда: молекулы агонистов NMDA типа обязательно образуют, среди прочих, и связь с C2 пунктом, если же связывания с этим пунктом нет, то лиганд будет проявлять свойства антагониста.

Другим важным выводом является предположение о том, что избирательными лигандами рецепторов NMDA будут молекулы таких трикислот как (2R,3R)-2-аминопентан-1,3,5-трикарбоновая и (2R,3R)-2-аминопентан-3-карбокси-5-фосфоновалериановая кислоты или их 2-метиламино-аналоги, которые, скорее всего, будут проявлять агонистические свойства. Во всяком случае, определение типа активности этих двух соединений позволит установить роль фосфоновой группировки в проявлении NMDA-антагонистической активности.

Модель фармакофора глутамат-связывающего сайта AMPA рецептора. Для построения модели глутамат-связывающего сайта рецепторов ВАР AMPA типа нами были выбраны три высокоактивных и избирательных лиганда этих рецепторов: 3-гидрокси-4,5,6,7-тетрагидроизоксазол[5,4-с]пиридин-5-карбоновая кислота (5-НРСА), 3-гидрокси-4,5,6,7-тетрагидроизоксазол[5,4-с]пиридин-7-карбоновая кислота (7-НРСА) и сама 2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота (АМРА).

Первые две молекулы являются конформационно жесткими и существуют только в одной стабильной конформации. Для молекулы 7-НРСА был проведен рентгено-структурный анализ и определены межмолекулярные расстояния, валентные и торсионные углы [Krogsgaard-Larsen et al., 1985]. Данные теоретического конформационного анализа в поле MM2 дают величины, совпадающие с межатомных расстояний, валентных и торсионных углов, подтверждающие экспериментальными, что свидетельствует о применимости данного метода расчета конформаций и для таких сложных гетероциклических соединений.

Расчетные данные совпадают с экспериментальными и для молекулы 5-НРСА. В этой работе [Krogsgaard-Larsen et al., 1985] показано, что предпочтительная конформация молекулы 5-НРСА, определенная методом ПМР-спектроскопии, очень похожа на конформацию молекулы 7-НРСА, определенную

кристаллографическим методом: оба гетероцикла образуют планарную структуру, а карбоксильная группа находится в экваториальном положении. Фармакологические профили этих соединений практически идентичны [Watkins et al., 1990], и поэтому можно утверждать, что геометрия молекул 5-НРСА и 7-НРСА совпадает с геометрией биологически активных конформаций молекул АМРА и L-глутаминовой кислоты на глутамат-связывающем сайте АМРА рецептора.

Конформационный анализ молекулы АМРА показал, что среди набора ее стабильных конформаций существует одна, близкая по параметрам к конформациям молекул 5- и 7-НРСА.

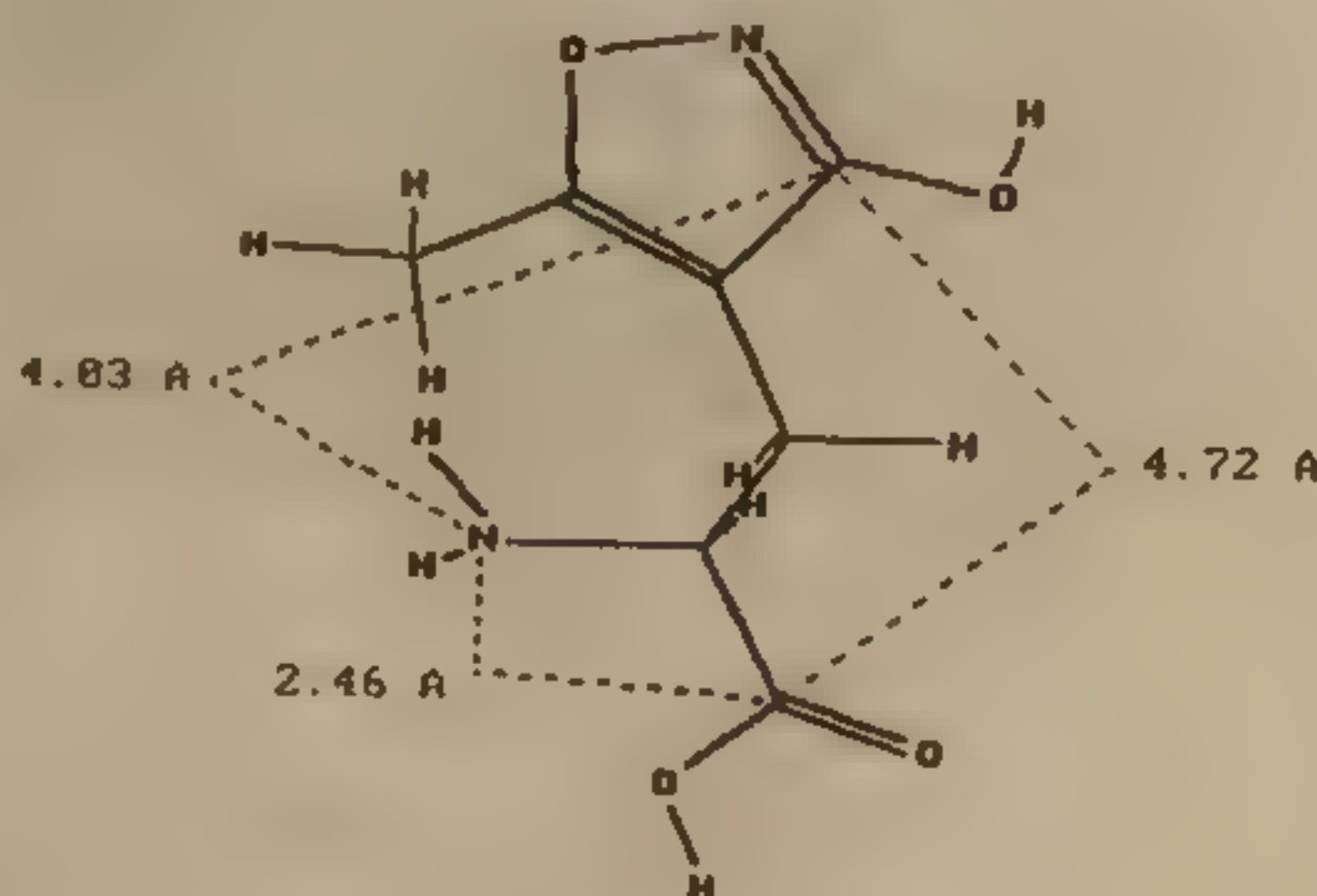


Рис. 8.5. Биологически активная конформация молекулы АМРА

Как и в случае NMDA рецептора, на основании данных по объему, занимаемому молекулой АМРА, можно определить геометрические параметры агонистического участка глутамат-связывающего сайта АМРА рецепторов. С учетом размеров атомов кислорода и ван-дер-ваальсовых радиусов место связывания характеризуется следующими параметрами: максимальная длина - 10.0 Å, максимальная ширина - 8.0 Å, максимальная высота - 7.3 Å. Вниз от плоскости, в которой лежат центральные атомы фармакоформных групп, границы молекулы агонистов выступают не более чем на 2.0 Å, что соответствует размерам карбоксильной группы. Вверх от этой плоскости в исследованной серии агонистов выступ превышает 5 Å. Это свидетельствует об отсутствии в этой области стерических препятствий. Другими словами, активный центр АМРА рецептора, так же как и NMDA рецептора, представляет собой открытую сверху впадину на постсинаптической мембране. Поэтому объемные структуры таких молекул как 5- и 7-НРСА не мешают им взаимодействовать со связывающим сайтом. Более того, даже замена метильной группы в положении 5 изоксазольного цикла молекулы АМРА на объемный трет-бутильный радикал не мешает ее взаимодействию с рецептором - 2-амино-5-трет-бутил-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота [АТРА] проявляет высокую агонистическую активность [Watkins et al., 1990]. Возможно также, что в связывающем сайте АМРА рецептора существует область гидрофобных взаимодействий, с которой и связываются алкильные группы в положении 5 изоксазольного цикла.

Сравнение глутамат-связывающих сайтов NMDA и АМРА рецепторов. Чем же отличаются друг от друга глутамат-связывающие сайты NMDA и АМРА

рецепторов. Во-первых, размеры связывающего сайта AMPA рецептора больше, что определяет возможность взаимодействия с ним более объемных молекул, связывание которых усиливается за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий с липофильной областью. Во-вторых, пункт С2 (связывающий ω -кислотный центр молекулы) расположен в другой области пространства. Если совместить α -связь, соединяющая атом углерода в положении 4 изоксазольного цикла с β -атомом углерода пропионильного остатка в молекуле AMPA, и связь, соединяющая карбоксильную группу с β -атомом углерода в молекуле NMDA, направлены в разные стороны. При этом кислый атом углерода в положении 3 изоксазольного цикла оказывается ниже плоскости, в которой находятся фармакофорные атомы молекулы NMDA (рис. 8.6).

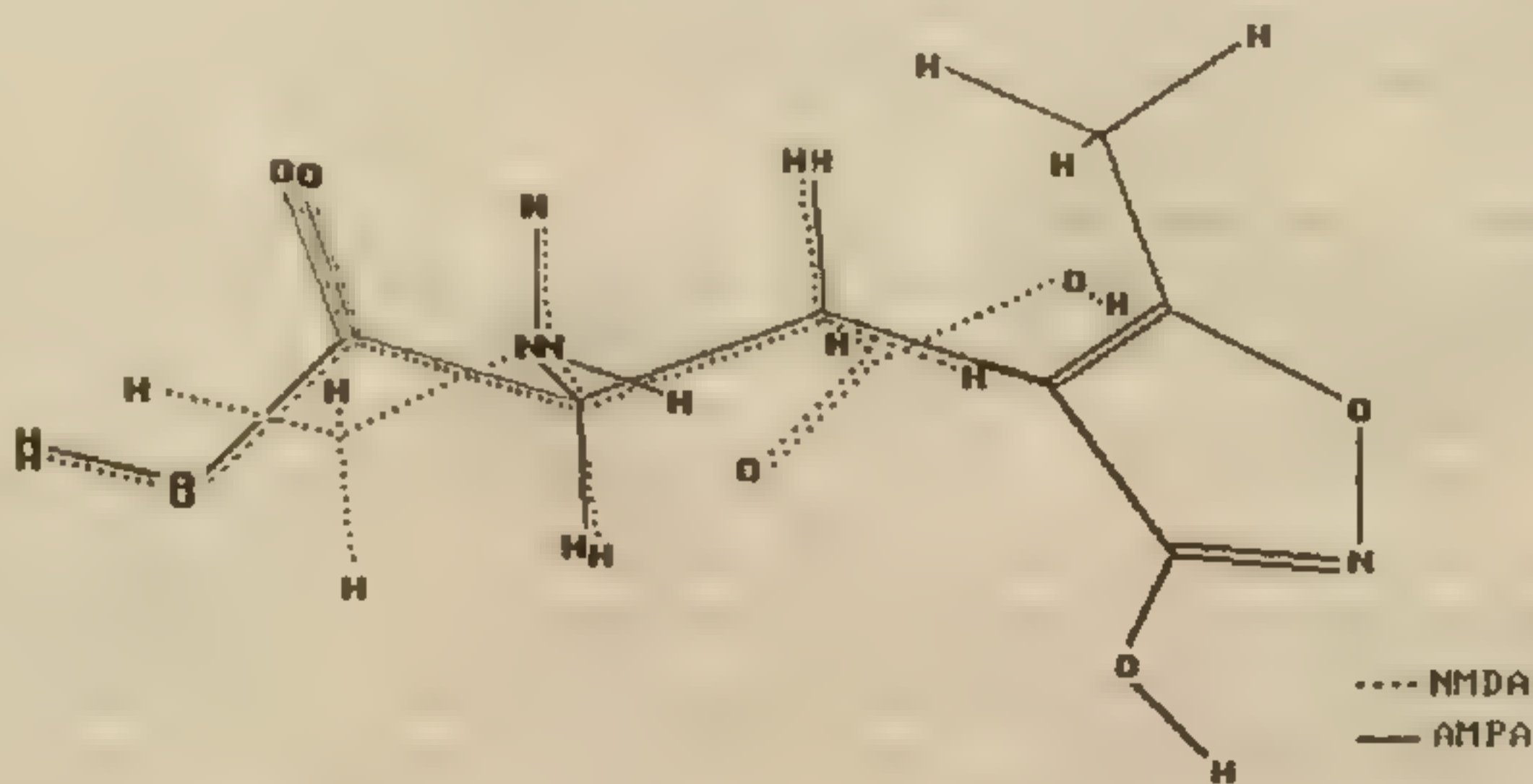


Рис. 8.6. Сравнение биологически активных конформаций молекул NMDA и AMPA.

Существенным фактором, не позволяющим молекуле NMDA взаимодействовать с AMPA рецептором, является наличие метильной группы у атома азота аминогруппы - в связывающем сайте AMPA рецептора нет липофильной полости, способной вместить даже маленький алкильный радикал у атома азота аминогруппы.

Среди лигандов рецепторов ВАР есть одно соединение, способное взаимодействовать со всеми типами рецепторов - эндогенный медиатор L-глутаминовая кислота. Ее молекула конформационно более гибкая, нежели молекулы NMDA, AMPA и многих других агонистов. И поэтому среди наиболее стабильных конформаций L-глутаминовой кислоты обнаруживаются и такие, в которых, в частности, расстояния между фармакофорными группами соответствуют фармакофорам как NMDA, так и AMPA рецепторов. Поэтому она и способна активировать все типы рецепторов ВАР (глутаматных рецепторов).

Предлагаемые модели позволяют объяснить еще один, неоднократно наблюдавшийся химиками и фармакологами, факт. Речь идет о том, что любое удлинение молекул агонистов рецепторов ВАР, не важно AMPA или NMDA типа, приводит к соединениям, проявляющим свойства NMDA антагонистов. Высшие гомологи аспарагиновой и глутаминовой кислот - 2-аминоадипиновая и 2-аминопимелиновая кислоты также проявляют свойства NMDA антагонистов

[Пиотровский, 1988]. Было показано, что удлинение цепочки, связывающей α -аминокислотную группировку с кислым 3-гидроксизоксальным циклом в аналогах иботеновой кислоты приводит к появлению у соединений NMDA-антагонистической активности (Brehm et al., 1988). Удлинение цепочки между терминальными карбоксильными группами в молекуле ODAP, агониста AMPA рецепторов, тоже приводит к соединениям, проявляющим свойства NMDA антагонистов - GIDAP и PtDAP кислотам [Piotrovsky et al., 1992]. Причина этого обращения действия и исчезновения способности к взаимодействию с AMPA рецептором у таких "удлиненных" молекул заключается в приобретении ими дополнительных степеней конформационной свободы, что и позволяет их ω -кислотным группам дотягиваться до пункта C3 NMDA рецепторного сайта.

Таким образом, предлагаемые трехмерные модели фармакофоров глутамат-связывающих сайтов рецепторов NMDA и AMPA типов позволяют объяснить некоторые закономерности, определяющие избирательность взаимодействия молекул лигандов с данным типом рецептора в зависимости от их структуры, и на рациональной основе планировать синтез новых соединений.

8.7. Липофильные производные ВАК

Актуальность поиска эффективных фармакологических средств среди производных медиаторных аминокислот продиктована их ролью в регуляции важнейших физиологических функций организма. Однако применение незамещенных аминокислот для лекарственной коррекции патологических состояний сопряжено с рядом трудностей, вызванных слабым проникновением этих высокополярных соединений, существующих при физиологических значениях pH в виде биполярных ионов, через гематоэнцефалический барьер. Решение проблемы транспорта аминокислот, также как и других полярных фармакологических активных соединений, может быть достигнуто созданием их пролекарств химической модификацией amino- и (или) карбоксильных групп липофильными, легко удаляемыми в организме заместителями. Одним из эффективных способов модификации аминогруппы является ее ацилирование, а для карбоксильной и других кислотных функций - этерификация. Такие модификации приводят, как правило, к значительному уменьшению гидрофильности их молекул [Vamvakides A., 1987; Пиотровский, Думпис, 1988]. Например, цетиловый эфир пролина является пролекарством для аминокислоты, так как, по данным фармакологического анализа, легко проникает через гематоэнцефалический барьер и после этого гидролизуетсся с выделением самого пролина [Гудашева, Островская, 1985].

Поэтому для изыскания подходов к синтезу пролекарств ВАК был синтезирован и исследован ряд диэфиров L-глутаминовой кислоты: дибензиловый (diBzl), диэтиловый (ДЭЭГ), диоктиловый (diC8), динониловый (diC9), дидециловый (diC10), диундециловый (diC11), дидодециловый (diC12), дитридециловый (diC13), дитетрадециловый (diC14), дипентадециловый (diC15) и дицетиловый (diC16) диэфиры.

Исследования гидролитической стабильности в сыворотке крови некоторых соединений этого ряда, а именно ДЭЭГ и diBzl, показали, что ДЭЭГ достаточно быстро гидролизуетсся до свободной кислоты (период полусуществования около 12 мин), тогда как за это же время эфир diBzl гидролизуетсся лишь до моноэфира. Высокая липофильность и низкая растворимость производных высших алифатических спиртов не позволили изучить их стабильность в сыворотке крови [Мишин и др., 1991].

Для всех диэфиров L-глутаминовой кислоты острая токсичность превышала 2000 мг/кг при в/б введении мышам. При анализе их противосудорожного действия на

модели коразоловых судорог оценивались латентный период возникновения судорог, вызванный введением коразола, и их продолжительность. Оказалось, что diC16 не только задерживал наступление судорог, но при его введении примерно 40% животных выживало, тогда как в контроле гибель животных всегда достигала 100%. В тоже время диэфир diC13, напротив, ускорял появление коразоловых судорог.

Фармакологическое исследование диэфиров (в дозах 100 мг/кг, мыши, крысы) продемонстрировало неоднородность профиля их фармакологического действия. Диэфиры diC11, diC12, diC14-C16 уменьшали, ДЭЭГ, diC10 и diC13 не влияли, а diBzl, напротив, увеличивал двигательную активность. Лишь diC13 и diC16 потенцировали наркотическое действие гексенала, а diC12 его ослаблял. Остальные диэфиры на длительность гексеналового сна не влияли. Умеренное антигипоксическое действие (на модели гипоксии с гиперкапнией, "баночная проба") проявил лишь diC10. Это действие по силе было сравнимо с таковым для гутимины в дозе 25 мг/кг. При оценке влияния соединений на сохранение УРПИ, выработанной в одной пробе у крыс, было установлено, что лишь diBzl улучшал сохранение навыка избегания, если его вводили непосредственно после обучения. Все остальные соединения были неэффективны.

Таким образом, приведенные выше данные позволяют предположить, что диэфиры L-глутаминовой кислоты проникают через гематоэнцефалический барьер, однако лишь два из них проявляют возбуждающее действие (диэфир diC12 уменьшает продолжительность гексеналового сна, а diBzl повышает двигательную активность и улучшает сохранение УРПИ). Возможно, что различия в фармакологическом действии диэфиров глутаминовой кислоты и высших алифатических спиртов связаны с их различной гидролитической стабильностью в организме. Однако в целом диэфиры высших алифатических спиртов (C8-C16) и L-глутамата проявляют свойства антагонистов рецепторов ВАК, что может свидетельствовать в пользу предположения об их высокой устойчивости в организме.

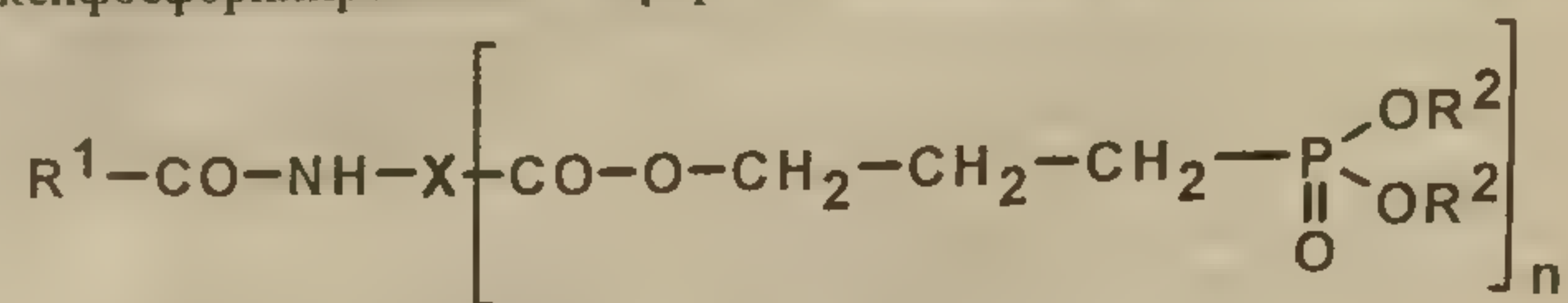
8.8. Фосфорилированные производные ВАК

Другое направление в создании ВАКергических соединений с улучшенными фармакодинамическими и фармакокинетическими характеристиками заключается в синтезе N-ацил- и N-алкилпроизводных фосфорилированных сложных эфиров медиаторных аминокислот, нового класса соединений, хорошо проникающих в мозг и обладающих выраженным нейротропным действием. Результаты фармакологического изучения кардиоваскулярных и психотропных эффектов новых фосфорсодержащих производных медиаторных аминокислот показали, что такая идея может получить практическую реализацию.

Кардиоваскулярные эффекты. Переходя к анализу накопленного фактического материала необходимо сделать вводное замечание. Все используемые для испытаний биологической активности соединения являются производными медиаторных аминокислот. При осуществлении синтеза изучаемых веществ и определении закономерностей их фармакодинамики в качестве основного критерия использован принцип последовательной модификации базовой структуры. По этой причине не все приведенные в книге соединения являются производными возбуждающих аминокислот, однако, как будет впоследствии показано, большинство из них в той или иной мере обладают ВАКергической активностью или необходимы для целостности представления их в качестве единой химической группы (таб. 8.6). Результаты скрининга показали, что направленность сосудистого действия соединений зависит не только от природы базовой аминокислоты, но и от характера связи между аминокислотным и фосфорильным фрагментами.

Таблица 8.6. Фосфорилированные производные медиаторных аминокислот.

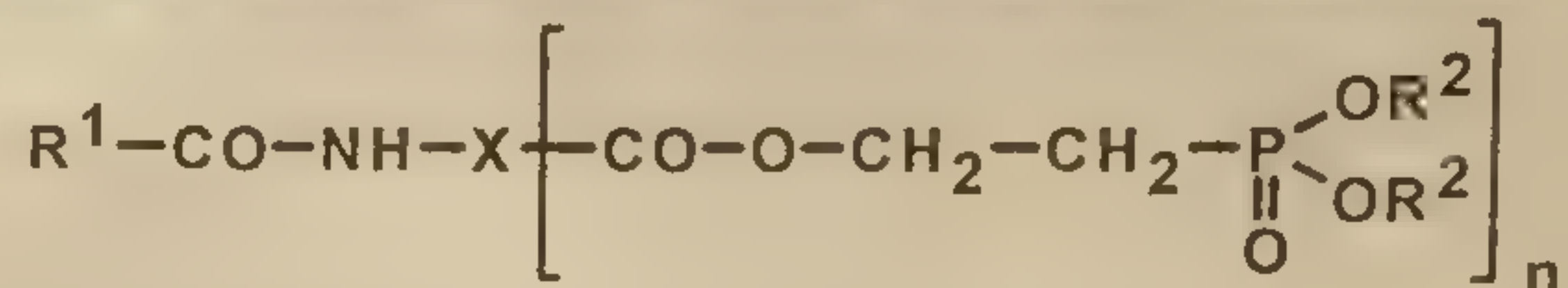
1. 3-Диалкоксифосфорилпропиловые эфиры N-ацилпроизводных аминокислот



R^1 = метил - пальмитоил; R^2 = метил - бутил; $n = 0, 1$

$X = CH_2; (CH_2)_2; (CH_2)_3; CH-CH_2-COOH; CH-CH_2-CH_2-COOH$

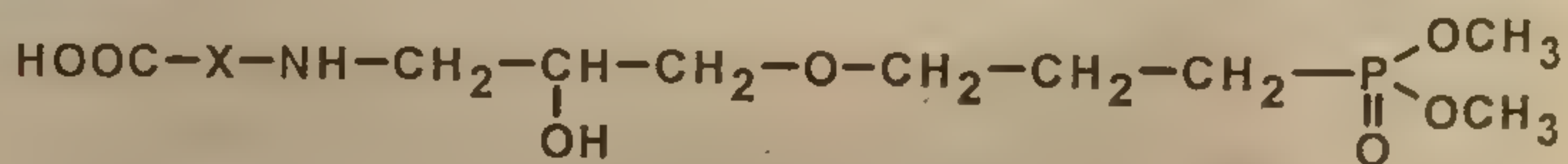
2. Диалкоксифосфорилэтиловые эфиры N-ацилпроизводных аминокислот



R^1 = метил, фенил; R^2 = метил - бутил; $n = 0, 1$

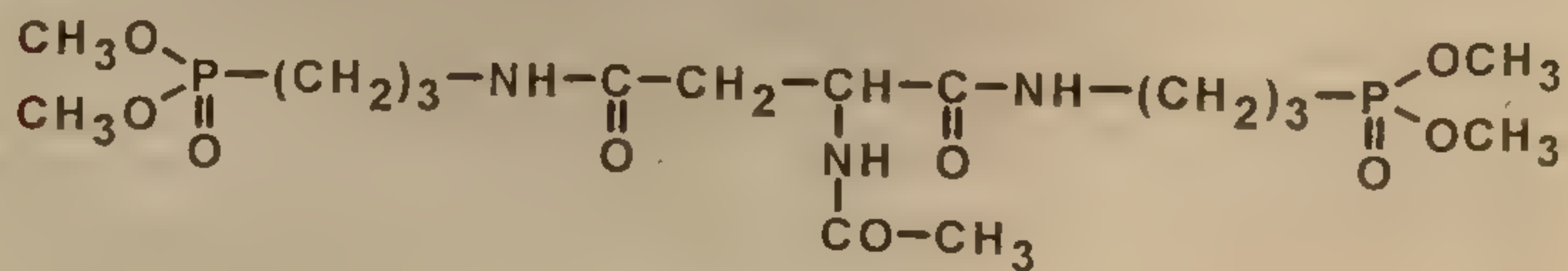
$X = CH_2; (CH_2)_2; (CH_2)_3; CH-CH_2-COOH; CH-CH_2-CH_2-COOH$

3. 3-(3-Диалкоксифосфорилпропокси)-2-окси-1-пропиловые эфиры N-ацилпроизводных аминокислот

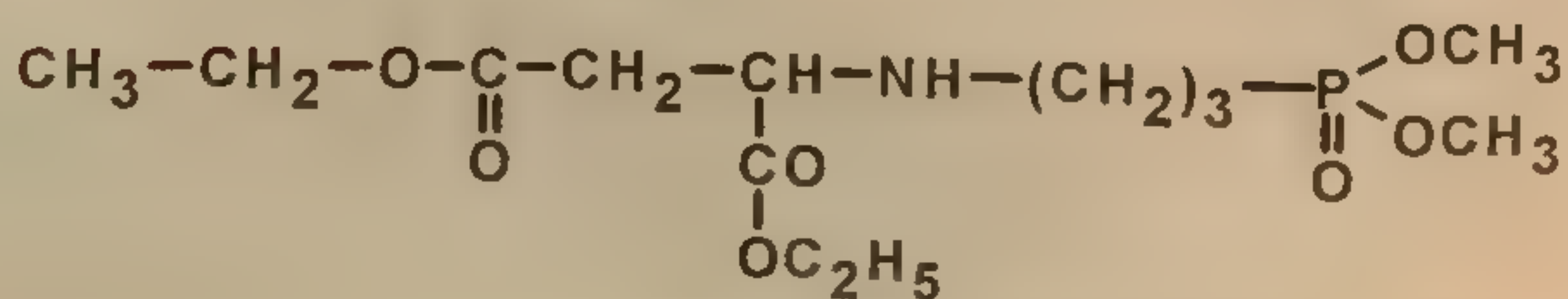


$X = CH_2; (CH_2)_2; (CH_2)_3; CH-CH_2-COOH; CH-CH_2-CH_2-COOH$

4. Другие производные



ПИР-13-Б



ПИР-21-Б

Так, все фосфорилированные сложные эфиры медиаторных аминокислот проявляли полное соответствие своего кардиоваскулярного действия с незамещенными аминокислотами. В то же время производные аминокислот, содержащие фосфорилированные заместители при атоме азота оказывали, как правило, депрессорное действие в отношении САД независимо от природы базовой аминокислоты. Первичное изучение сосудистого действия соединений позволило выявить несколько веществ для углубленного фармакологического исследования, в том числе с гипертензивным (ПИР-87-2-0; -16-0; -17-0; -18-0; АКФ-90-11 и -90-12) и с гипотензивным (ПИР-13-Б и АКФ-89-5) действием [Озеров, 1993].

Установлено, что наиболее активное соединение этого ряда-ПИР-87-2-0 приводит к повышению САД в течение 2 часов, обусловленному усилением деятельности сердца (повышение МОК, УО и РЛЖ) и увеличением общего периферического сопротивления, превосходя по длительности эффекта препарат сравнения мезатон.

Обратный (гипотензивный) эффект получен у соединений ПИР-13-Б и АКФ-89-5, вызывающих при внутривенном введении в дозах 30-100 мг/кг выраженное (20-34%) понижение САД (в основном за счет снижения ОПС) длительностью свыше 1 часа и максимумом эффекта на 5-15 минут после введения [Петров, 1995] (рис. 8.7.1 и 8.7.2).

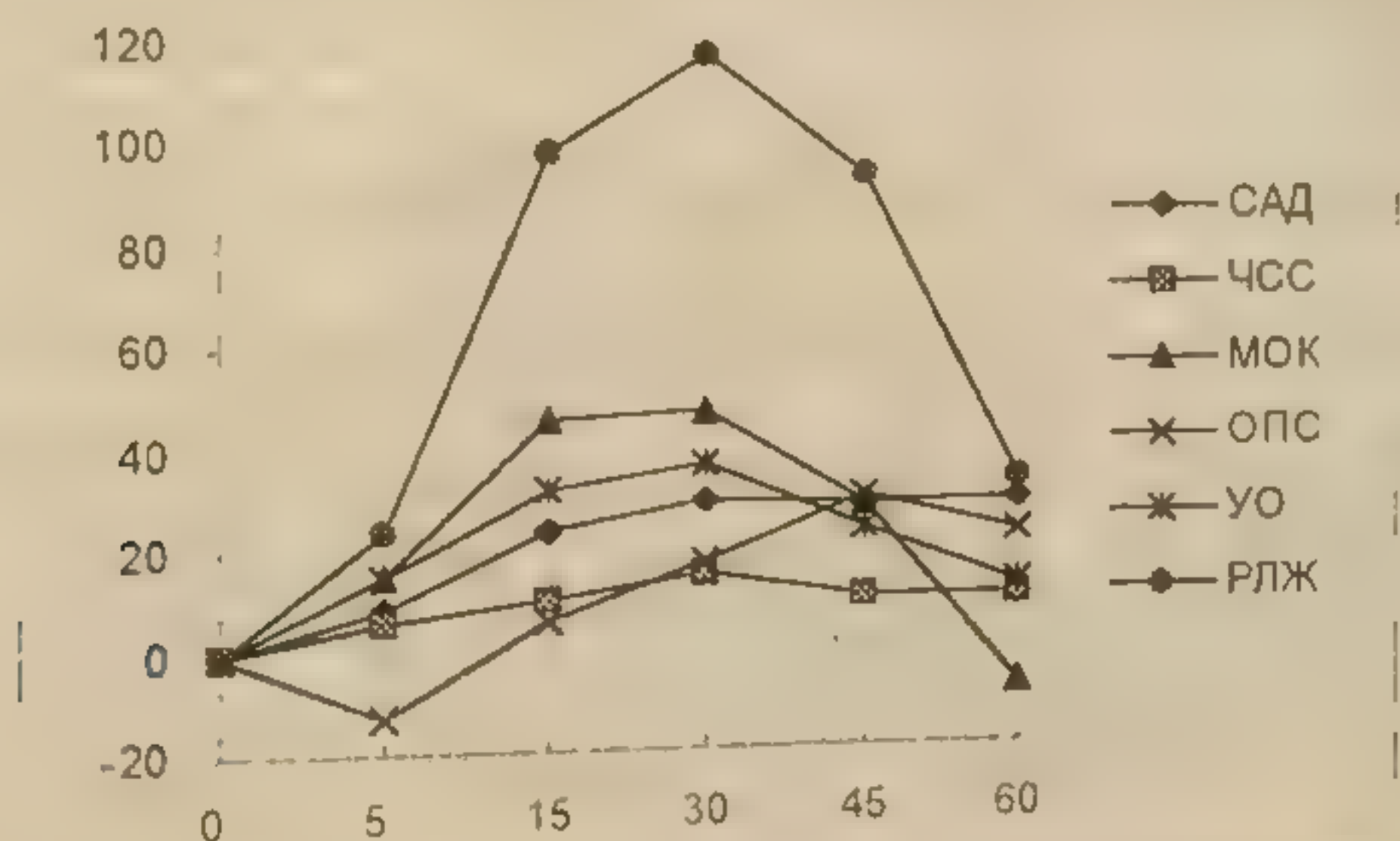


Рис.8.7.1 Структура гемодинамического ответа при введении соединения ПИР-87-2-0. Условные обозначения: САД - системное артериальное давление; ЧСС - частота сердечных сокращений; МОК - минутный объем крови; ОПС - общее периферическое сопротивление; УО - ударный объем; РЛЖ - работа левого желудочка. По оси абсцисс: время, мин; по оси ординат: проценты изменения показателя по сравнению с исходом.

Фармакологическая оценка кардиоваскулярной активности изолированных фрагментов изучаемых соединений подтвердила высказанное предположение. Было показано, что системное (внутривенное) и внутрицентральное (в IV желудочек) введение N-ацетиласпартата и N-ацетилглутамата приводит к мощному подъему САД, сопровождающемуся увеличением показателей деятельности сердца и общего периферического сопротивления; в то время как фосфорный фрагмент (3-(диметоксифосфорил)пропанол; ДМФП) не влияет на выраженность гемодинамического ответа (рис. 8.8).

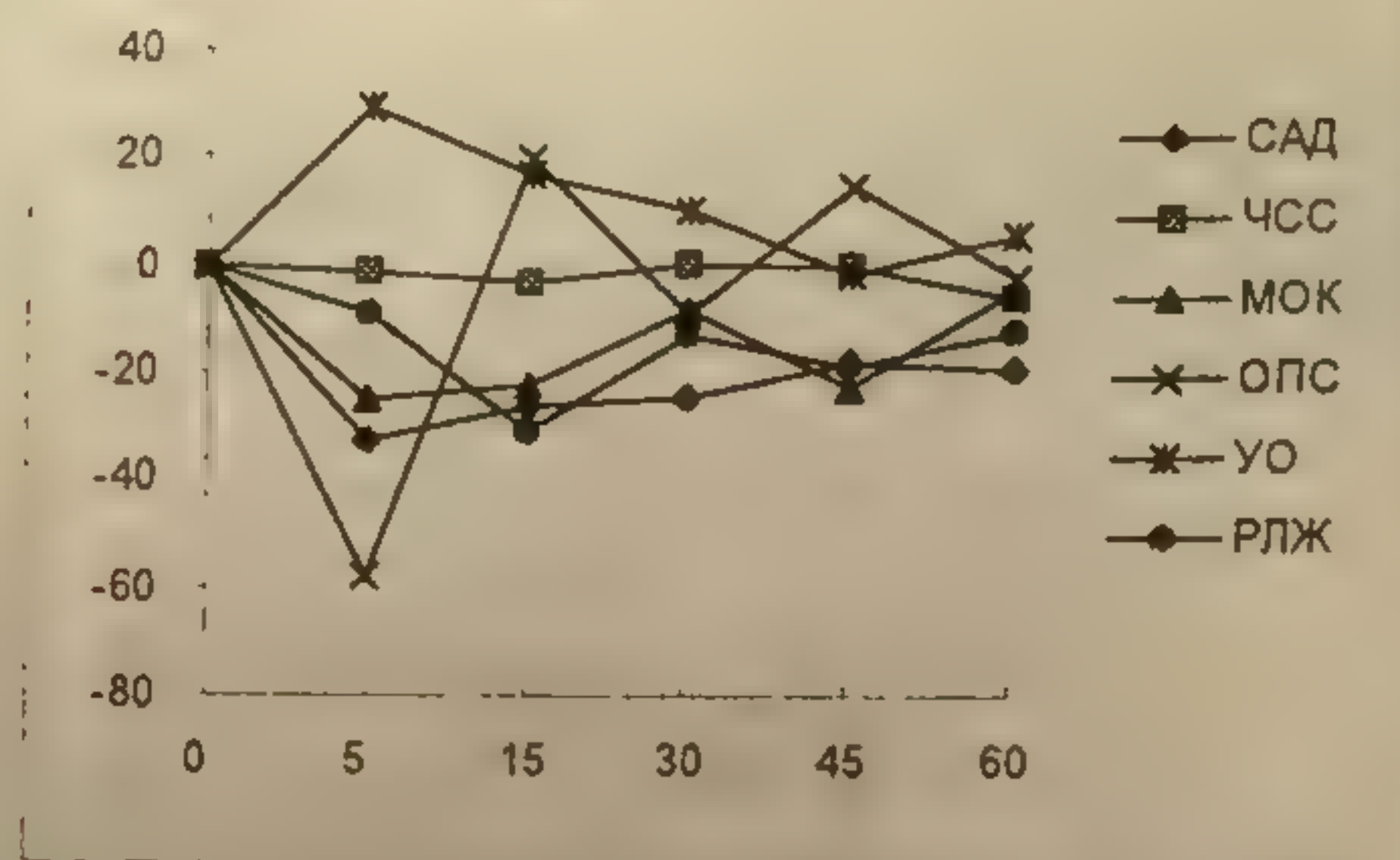


Рис.8.7.2 Структура гемодинамического ответа при введении соединения ПИР-13-Б. Условные обозначения: см.рис.8.7.1.

Изучение нейрофизиологических аспектов механизма действия соединений показало соответствующее усиление (ПИР-87-2-0) и угнетение (ПИР-13-Б) под влиянием веществ тонической активности и сомато-симпатических рефлекторных ответов в нижнем сердечном нерве кошки, что позволило говорить о влиянии соединений на центральные механизмы сердечно-сосудистой регуляции [Озеров, 1993].

Анализируя химическую структуру наиболее активных соединений, следует обратить внимание на то, что эти соединения являются производными N-ацетиласпарагиновой (ПИР-13-Б) и N-ацетилглутаминовой (ПИР-87-2-0) кислот, которые являются активными метаболитами нервной ткани, и участвуют в процессах регуляции синаптической передачи в ВАКергических нейронах. Учитывая сказанное, было высказано предположение, что эти фрагменты аналогов медиаторных аминокислот являются фармакофорами их центральных сосудистых эффектов [Петров, 1995].

Проведенные нами исследования по влиянию веществ на фоновую и рефлекторную активность сосудодвигательных структур вентролатеральной поверхности продолговатого мозга показали участие в реализации гемодинамических эффектов нейрональных структур бульбарного вазомоторного центра, причем депрессорные реакции веществ зависели от преимущественной активации NMDA рецепторов каудальной зоны, в то время как выраженность прессорных ответов зависела от активации рецепторов АМРА типа вентрального отдела бульбарного центра (рис. 8.9). Полученные данные, с одной стороны, доказывают глутаматергический механизм реализации гемодинамического эффекта изучаемого ряда соединений, с другой, свидетельствуют о сложном механизме ВАКергической регуляции гемодинамического ответа, являющегося результатом взаимодействия реакций прессорной и депрессорной вазомоторных зон различной рецепторной подчиненности.

Оценивая полученные результаты, можно сформулировать сущность фармакологического действия фосфорсодержащих эфиров ВАК, оказывающих прессорное действие (рис. 8.10). Из приведенного рисунка видно, что остатки N-ацетиласпартата (или глутамата), благодаря присутствию фосфорного фрагмента, хорошо проникает через ГЭБ. В ЦНС происходит гидролиз и отщепление фосфорсодержащих частей, а высвободившийся фармакофор

оказывает непосредственное рецепторное действие, препятствуя одновременно обратному захвату эндогенного глутамата.

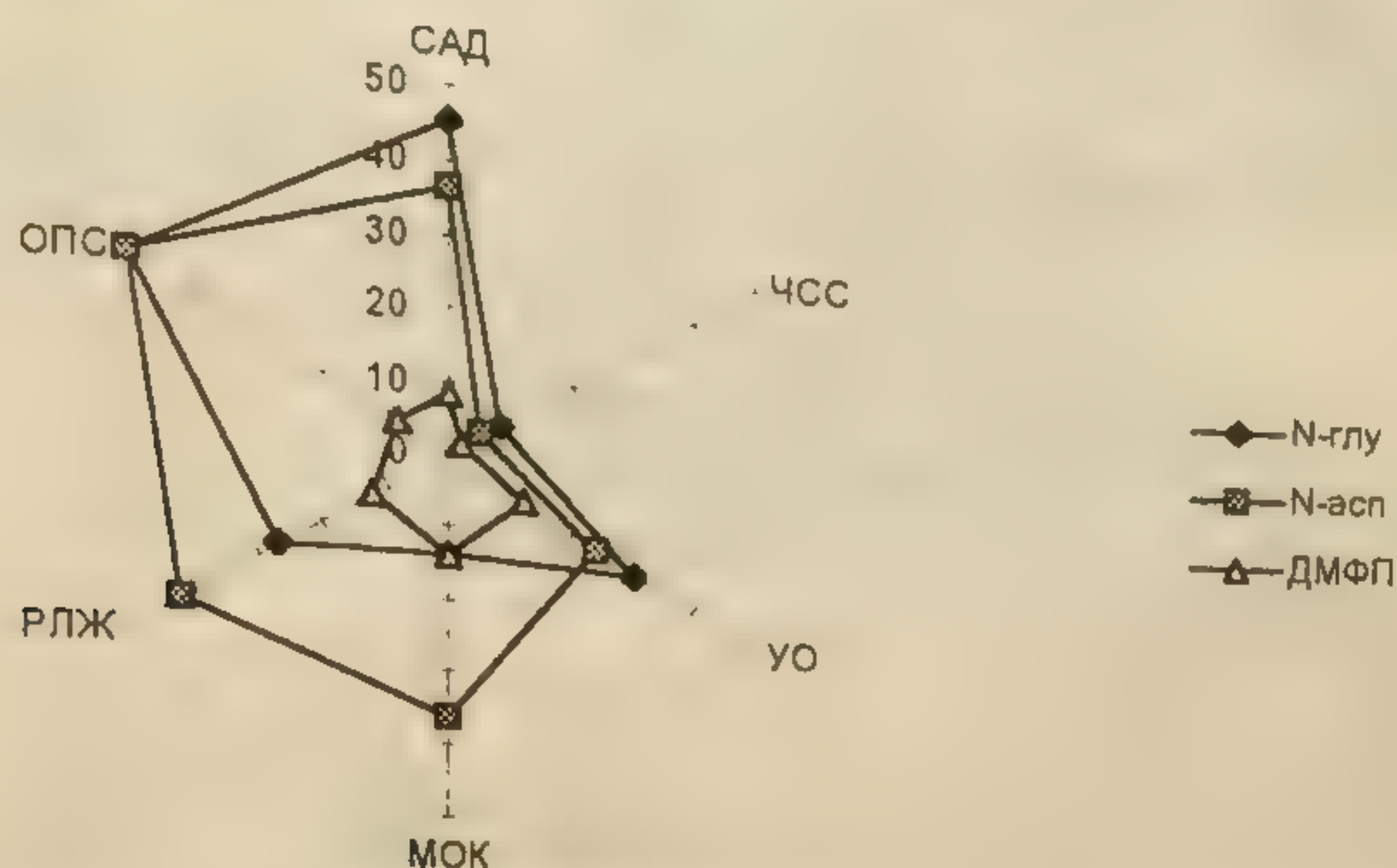


Рис.8.8. Влияние структурных фрагментов фосфорсодержащих производных аминокислот на системную гемодинамику. Объяснения в тексте.

В случае присутствия амидной связи, значительно слабее подверженной действию эндогенных гидролаз [Озеров, 1993] происходит, видимо, блокирование утяжеленной молекулой ВАКергического рецепторного комплекса, чем и обусловлен гипотензивный эффект соединения ПИР-13-Б.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что фосфорилированные производные аминокислот являются высокоэффективными и малотоксичными соединениями с центральным ВАКергическим механизмом сосудистого действия, гемодинамические эффекты которых значительно превосходят действие эталонных гипотензивных и гипертензивных средств. Проведенные исследования позволяют надеяться на перспективность дальнейшего изучения этих соединений для создания эффективных сердечно-сосудистых препаратов.

Психотропные эффекты. Проведенные исследования кардиоваскулярных свойств фосфорилированных аналогов медиаторных аминокислот, представленные в предыдущей главе, привели нас к выводу о наличии у данной группы соединений ярко выраженной нейротропной активности. Была доказана зависимость гемодинамических эффектов веществ от влияния на ВАКергические терминалы вазомоторных центров спинного и продолговатого мозга. Логично было бы предположить возможность аналогичного действия соединений и на вышележащие структуры ЦНС, участвующие в регуляции психических функций.

В ходе дальнейших исследований была подтверждена высказанная гипотеза. Было показано наличие в ряду фосфорсодержащих производных медиаторных аминокислот эффективных анальгетических, анксиолитических, антидепрессивных и ноотропных средств. Выбор соединений для комплексного исследования их психофармакологических свойств был осуществлен на основе анализа результатов

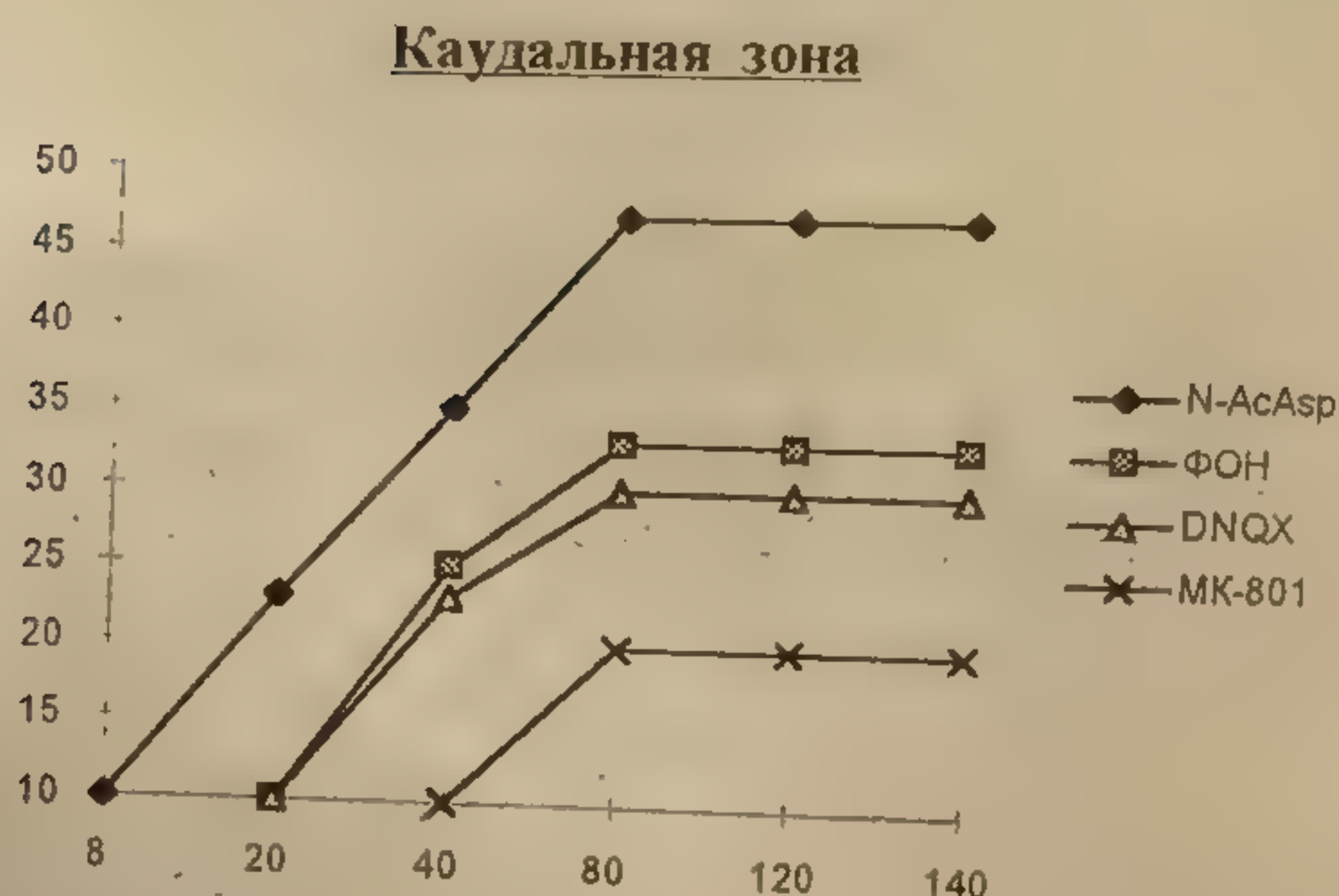
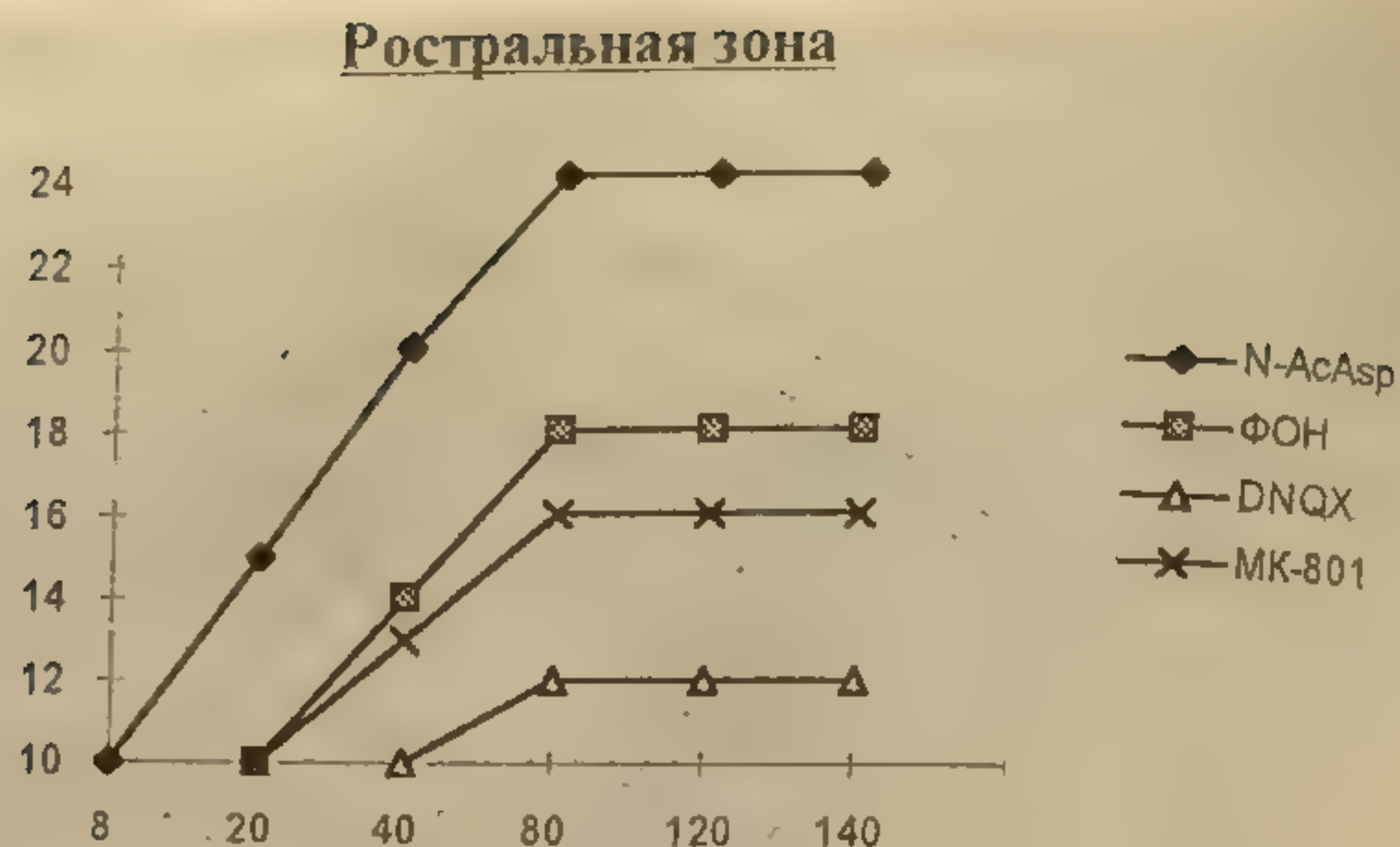


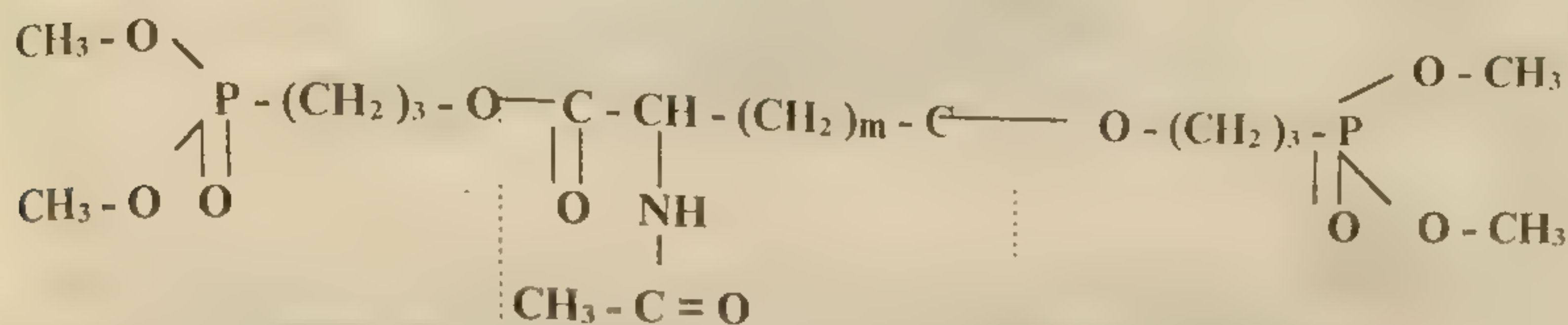
Рис.8.9. Влияние селективных антагонистов ВАК рецепторов на амплитуду ответа нейронов ростральной и каудальной зон вентромедиальной поверхности продолговатого мозга при микроинъекциях N-ацетиласпартата. По оси абсцисс: сила стимула, В; по оси ординат: амплитуда ответа, мкВ.

изучения их кардиоваскулярных и токсических характеристик, данных вычислительного прогноза биологической активности, а также с учетом технологической доступности веществ, что является одним из важнейших факторов, определяющих перспективы их практического внедрения.

В ходе проведенных исследований было показано, что проявление психостимулирующих или психоседативных эффектов изученных веществ определяется тремя факторами: природой базовой аминокислоты, строением липофильного фосфорсодержащего фрагмента и характером химической связи между ними [Ковалев и др., 1990а].

Так, сложные эфиры возбуждающих, и тормозных аминокислот, содержащие диалкоксифосфорилалкильный заместитель непосредственно при карбоксильной группе, оказывали дозозависимое психостимулирующее действие, наиболее отчетливо выраженное у производных дикарбоновых аминокислот (ПИР-87-6-О, АКФ-90-15, АКФ-92-1, АКФ-92-4 и АКФ-92-8) и проявляющееся в увеличении двигательной и исследовательской активности животных (рис. 8.11).

р-2В то же время для соединений третьего ряда, дополнительно содержащих фрагмент глицерина между аминокислотной основой и остатком фосфорилированного спирта, наблюдалась обратная тенденция: производные дикарбоновых аминокислот АКФ-89-1 и АКФ-89-2 соответственно в дозах 50-100 и 10-100 мг/кг достоверно снижали спонтанную двигательную активность и разнонаправленно влияли на ориентировочно-исследовательское поведение животных.



3-ДМФП	N-ацетиласпартат N-ацетилглутамат	3-ДМФП
липофильность	связь с рецептором	липофильность

Рис.8.10. Функциональные свойства структурных фрагментов фосфорсодержащих эфиров ВАК. Объяснение в тексте.

В четвертом ряду соединений, относящихся к N-алкилированным производным аминокислот со свободной карбоксильной группой, производные возбуждающих дикарбоновых аминокислот АКФ-89-16 и АКФ-89-17 не влияли на поведенческую активность животных, а производные тормозных аминокислот глицина (АКФ-90-7) и β -аланина (АКФ-90-8) в дозах 10 и 50, но не 100 мг/кг. достоверно повышали ее показатели.

Наконец, представитель пятой группы веществ ПИР-21Б (50 мг/кг) оказывал отчетливое психоугнетающее действие.

Интересные результаты были получены при исследовании антиамнестических свойств фосфорилированных производных аминокислот. Показано, что сложные эфиры N-ацетил-L(DL)-аспарагиновой кислоты (ПИР-87-6-О, АКФ-92-4 и АКФ-92-10) проявляют отчетливое антиамнестическое действие, улучшая сохранность навыка воспроизведения УРПИ, нарушенного транскорнеальным электрошоком. Наибольшей активностью на данной поведенческой модели обладало соединение ПИР-87-6-О. Однако, 2-диметоксифосфорилэтильные аналоги этого соединения АКФ-92-4 (50 мг/кг) и АКФ-92-10 (10 и 50 мг/кг), обладающие более лабильными сложноэфирными связями, превосходили по выраженности антиамнестического действия как ПИР-87-6-О, так и эталонный ноотропный препарат пирацетам (400 мг/кг), при этом антиамнестические эффекты АКФ-92-10, имеющего L-конфигурацию базовой аминокислоты, превосходили эффекты рацемического аналога АКФ-92-4 [Озеров и др., 1993].

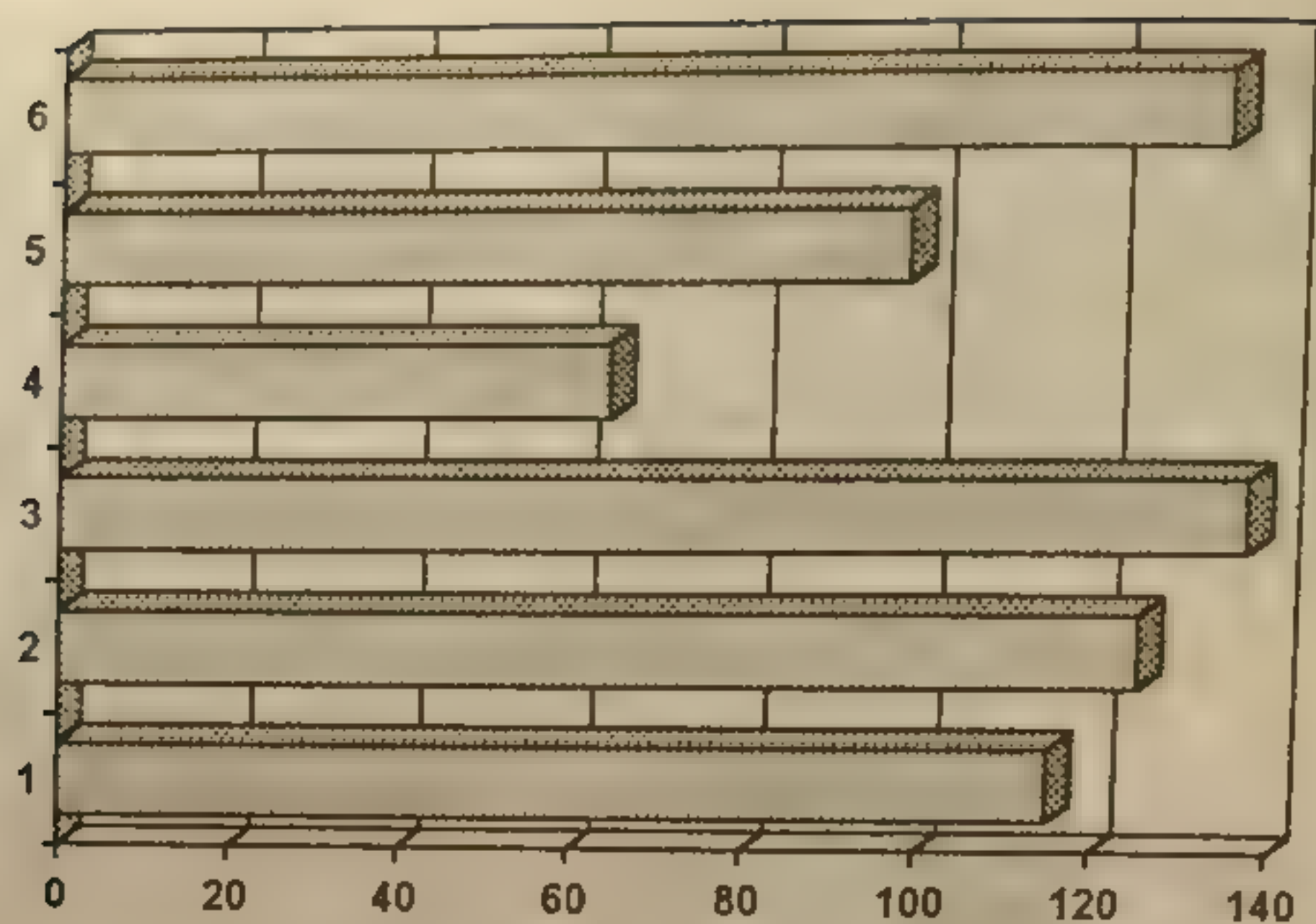


Рис.8.11. Влияние фосфорилированных производных медиаторных аминокислот на двигательную активность крыс в "открытом поле". Условные обозначения: 1- ПИР-87-6-0; 2- АКФ-90-15; 3 - АКФ-92-4; 4 - АКФ-89-1; 5 - АКФ-90-7; 6- АКФ-89-16 (все в дозе 50 мг/кг). По оси абсцисс - изменение показателя по сравнению с контролем, принятым за 100%.

Углубленное изучение антиамнестической активности наиболее эффективных ноотропных средств, выявленных на этапе психотропного скрининга (ПИР-87-6-0; АКФ-89-4; АКФ-90-7), было продолжено на моделях экспериментальной патологии памяти. Изучение ноотропной активности указанных фосфорилированных производных медиаторных аминокислот было осуществлено с использованием традиционных для психофармакологии методов с применением отрицательного (электроболевого - УРАИ или низкотемпературного - плавательный тест Морриса) и положительного (пищевого - 8-лучевой радиальный лабиринт) подкреплений.

В ходе экспериментов было установлено достоверное увеличение скорости обучения навыку рефлекторного избегания аверсивного раздражителя животных, получавших соединение ПИР-87-6-0 (50 мг/кг) по сравнению с животными контрольной группы. Аналогичное действие оказывали 2-диметоксифосфорилэтильные аналоги ПИР-87-6-О - соединения АКФ-92-4 и АКФ-92-10, а также производные β -аланина (АКФ-89-4) и глицина (АКФ-90-7), позитивно влиявшие на динамику обучения УРАИ у крыс (рис. 8.13).

Среди других соединений, обнаруживших ноотропную активность, следует отметить 3-диметоксифосфорилпропокси-2-окси-1-пропиловый эфир N-ацетил- β -аланина (АКФ-89-4), который в дозах 10 и 100 мг/кг в 2 - 2,5 раза увеличивал латентный период захода в темный отсек и значительно сокращал суммарное время нахождения в нем животных по сравнению с контролем. N-замещенный глициновый аналог этого соединения АКФ-90-7 также проявил выраженную антиамнестическую активность в дозе 10 мг/кг [Озеров, 1993] (рис. 8.12).

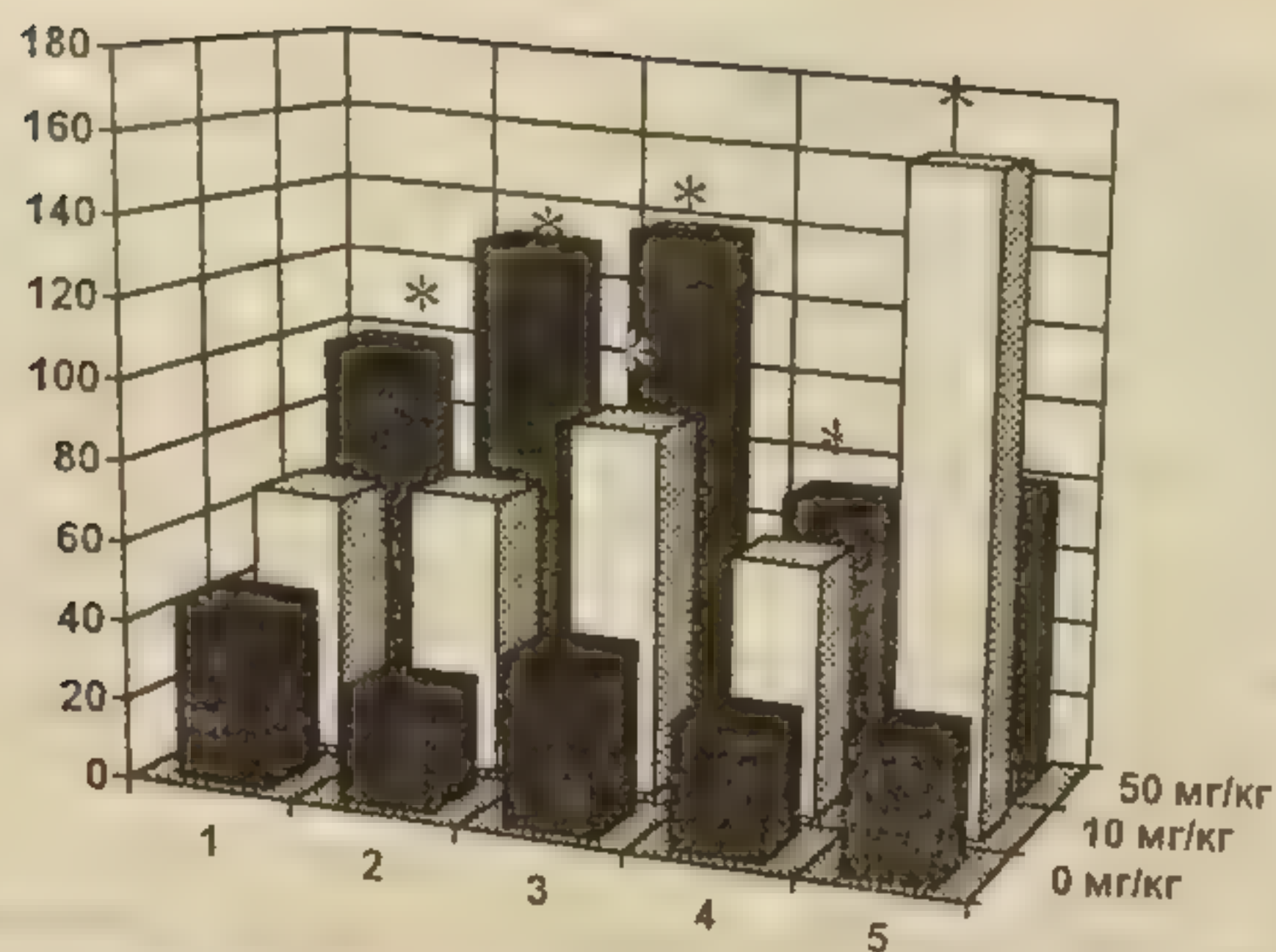


Рис.8.12. Влияние фосфорилированных производных медиаторных аминокислот на сохранность навыка условной реакции пассивного избегания (УРПИ).

Условные обозначения: 1- ПИР-87-6-0; 2 - АКФ-92-4; 3 - АКФ-92-10; 4- АКФ-89-4; 5- АКФ-90-7.

По оси ординат: время захода в темный отсек, сек.

*) - достоверность отличий по сравнению с контролем; $p < 0.05$ критерий Уитни-Манна.

При тестировании соединений в условиях положительного эмоционального подкрепления (8-лучевой радиальный лабиринт) также было показано наличие положительной динамики обучения пространственному навыку у экспериментальных животных по сравнению с животными контрольной группы.

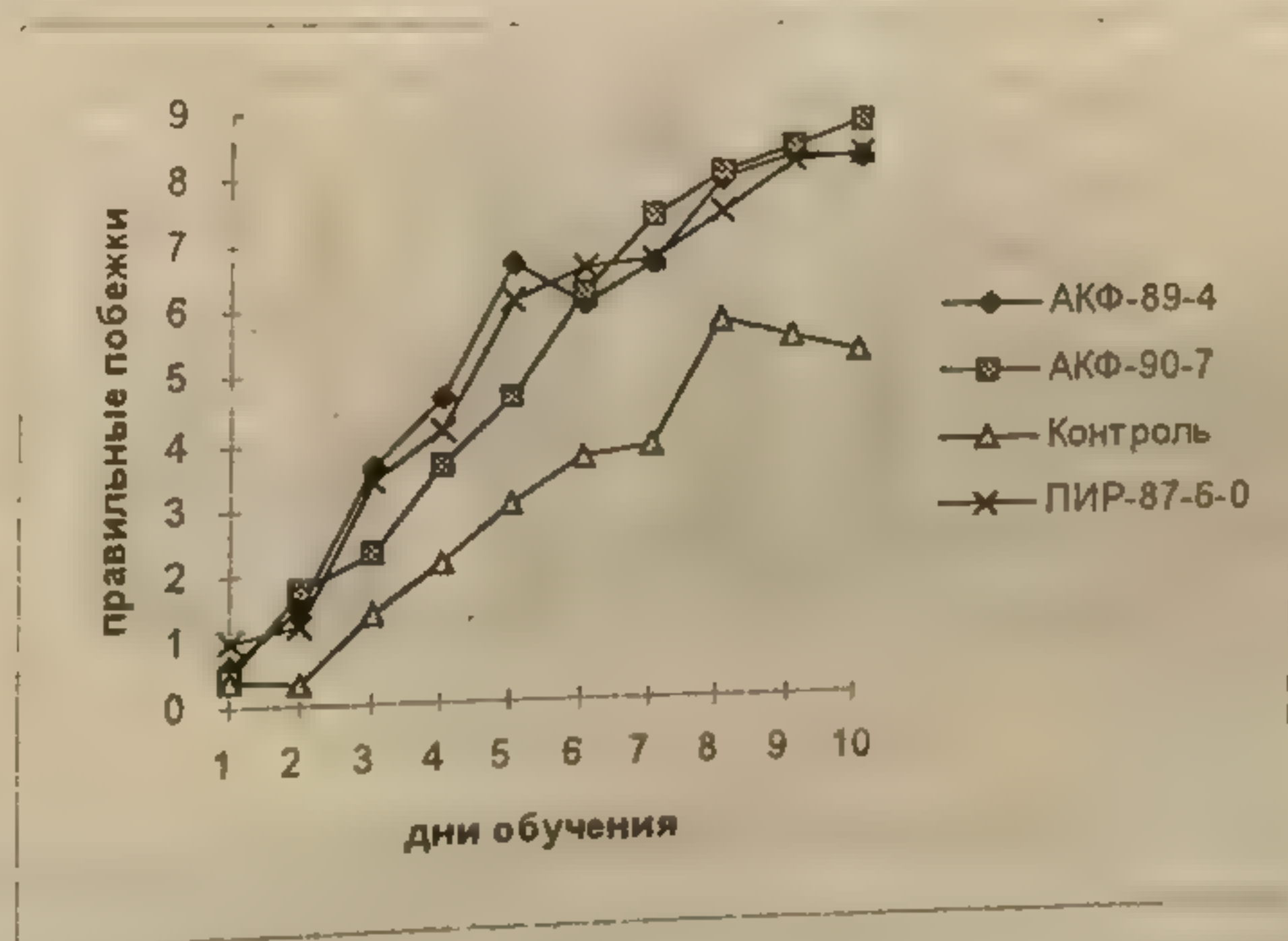


Рис.8.13. Динамика обучения условной реакции активного избегания (УРАИ) у крыс при введении фосфорилированных производных медиаторных аминокислот.

С целью подтверждения глутаматергического механизма ноотропного действия фосфорилированных производных медиаторных аминокислот было изучено формирование поведенческого навыка на моделях амнезии, вызванной введением неконкурентного антагониста NMDA рецепторного комплекса - МК-801. В ходе экспериментов было показано, что внутрибрюшинное введение обученным животным соединения МК-801 в дозе 0,3 мг/кг за 30 мин до тестирования вызывало выраженную амнезию УРП и нарушение выработанного пространственного навыка у крыс в водном лабиринте. Амнестическое действие этого агента достоверно уменьшалось при введении исследуемых соединений, среди которых наиболее эффективными были ПИР-87-6-О (10 мг/кг) и АКФ-90-7 (10 мг/кг), что свидетельствует о возможной реализации ноотропных эффектов веществ с участием глутаматергической системы мозга.

При изучении антидепрессивных свойств представленных веществ было установлено, что практически все соединения, обладающие антамнестическими свойствами (за исключением АКФ-90-7), проявляли активность в тесте форсированного плавания, что, возможно, свидетельствует о едином механизме, лежащем в основе наблюдаемых психотропных эффектов веществ. Среди остальных исследованных соединений только АКФ-92-5 (производное DL-глутаминовой кислоты) и АКФ-92-6 (производное γ -аминомасляной кислоты) оказали выраженное антидепрессивное действие в дозах 100 и 10 мг/кг, соответственно, в то время как менее склонные к гидролитическому расщеплению 3-диметоксифосфорилпропильные структурные аналоги этих веществ ПИР-87-2-О и ПИР-87-5-О оказались неактивными (рис. 8.14).

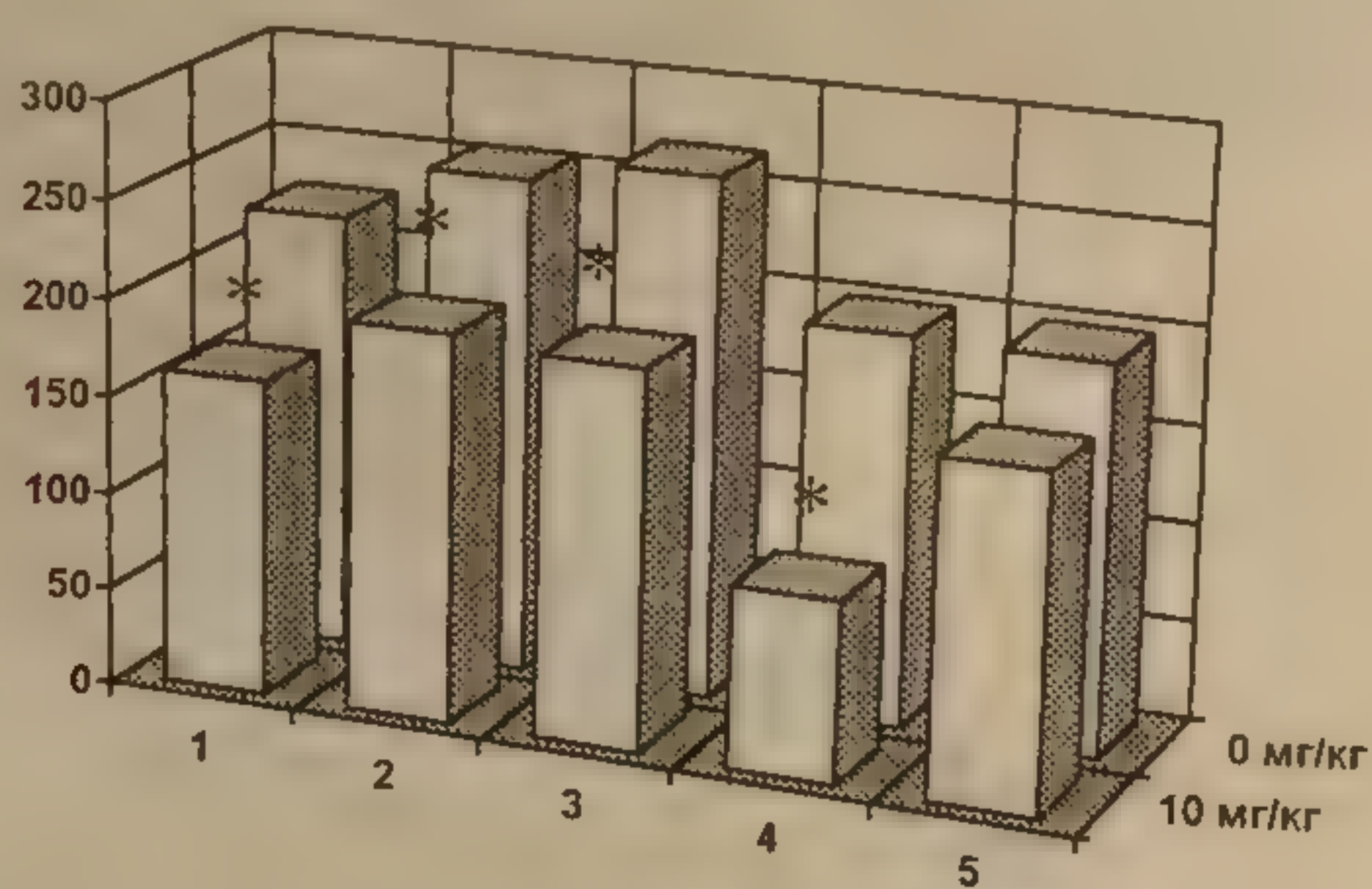


Рис.8.14. Антидепрессивные свойства фосфорилированных производных медиаторных аминокислот в тесте форсированного плавания. Условные обозначения: 1- ПИР-87-6-О; 2- АКФ-92-4; АКФ-92-10; АКФ-89-4; АКФ-90-7.

По оси ординат - время иммобилизации, сек.

*) - достоверность отличий по сравнению с контролем; $p < 0.05$ критерий Уитни-Манна.

Изучение противосудорожного действия веществ показало, что синтезированные производные медиаторных аминокислот оказывают разнонаправленное действие на общую продолжительность и длительность каждой из фаз судорожного припадка, вызванного транскорнеальным электрошоком. Все фосфорилированные сложные эфиры N-ацетил-аспарагиновой кислоты (ПНР-87-6-О, АКФ-90-15, АКФ-90-2 и АКФ-92-4) и N-ацетил-глутаминовой кислоты (ПНР-87-2-О, АКФ-92-1 и АКФ-92-5) практически не влияли на общую продолжительность судорог, и только производное L-аспарагиновой кислоты - АКФ-90-10 в дозе 50 мг/кг незначительно увеличивало длительность судорожного припадка. В отличие от них О- и N-замещенные производные дикарбоновых аминокислот, дополнительно содержащие фрагмент глицерина, обладали выраженной активностью: сложные эфиры АКФ-89-1 и АКФ-89-2 в дозах 50 - 100 мг/кг достоверно сокращали длительность судорог, а N-(3-диметоксифосфорилпропокси)-2-окси-1-пропильные производные АКФ-89-16 и АКФ-89-17 потенцировали судорожный припадок [Озеров и др., 1993].

Особый интерес в этом плане представляет соединение АКФ-89-17 (N-замещенное производное DL-аспарагиновой кислоты), обладающее на один-два порядка более высокой токсичностью по сравнению с другими фосфорилированными производными дикарбоновых аминокислот ($LD_{50} = 45$ мг/кг), которое при внутрибрюшинном введении мышам в субтоксических и токсических дозах (40 - 160 мг/кг) вызывает дозозависимые тонико-клонические судороги, сопровождающиеся гибелью животных (рис. 8.18). При этом проконвульсивный потенциал соединения АКФ-89-17 при внутрибрюшинном введении не уступает действию NMDA. Аналогичное проконвульсивное действие вызывает и глутаматный аналог АКФ-89-16, но в значительно более высоких дозах (750 - 3000 мг/кг, $LD_{50} = 400$ мг/кг).

Высокий проконвульсивный потенциал соединения АКФ-89-17 может быть объяснен тем обстоятельством, что это вещество является липофильным структурным аналогом NMDA и, по всей вероятности, как и NMDA, может выступать в роли агониста соответствующих рецепторов медиаторной системы возбуждающих аминокислот в ЦНС [Озеров, 1993].

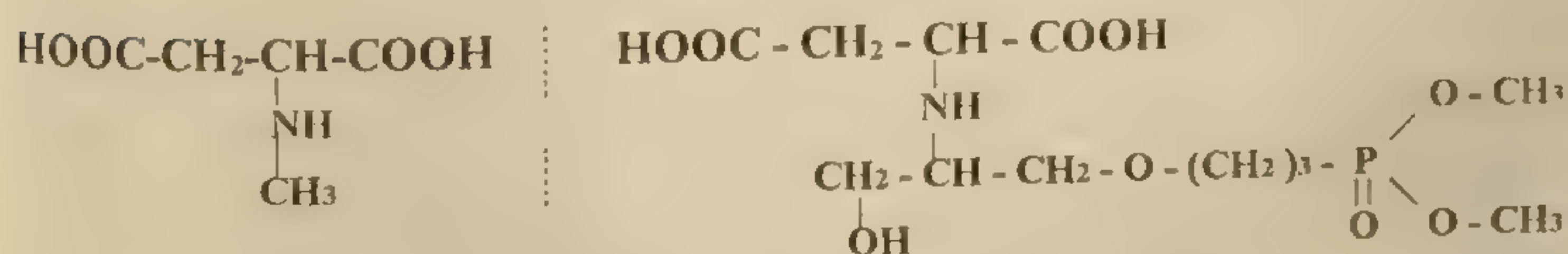


Рис.8.15. Структурное сходство соединений АКФ-89-17 и NMDA.

Фосфорилированные сложные эфиры тормозных монокарбоновых аминокислот, независимо от принадлежности к тому или иному рассматриваемому ряду соединений, проявляли противосудорожную активность, наиболее выраженную у АКФ-92-2 (производное глицина) и АКФ-92-7 (производное β -аланина) [Петров и др., 1995].

При анализе анальгетических свойств соединений не было выявлено какой-либо связи между их химическим строением и влиянием на пороги восприятия и вокализации животных при их электрораздражении переменным током. Так,

2-диметоксифосфорилэтиловый эфир N-ацетилглицина (АКФ-92-3) в дозах 10 и 50 мг/кг достоверно понижал порог восприятия у крыс, в то время как его бензоильный аналог АКФ-92-2 в дозах 10 - 100 мг/кг обладал анальгетическими свойствами. Аналогичным образом замена N-ацетильной группы соединения АКФ-92-10 на N-(1-адамантаноильную) (АКФ-92-9) приводит к обращению направленности анальгетического действия.

Таким образом, проведенное первичное изучение психофармакологических свойств новых фосфорсодержащих производных медиаторных аминокислот показало, что эти соединения обладают широким спектром психотропной активности, в котором наиболее выражены антиамнестические и антидепрессивные эффекты. Обнаруженная корреляция психотропных свойств незамещенной N-ацетил-L(DL)-аспарагиновой кислоты и ее фосфорилированных сложных эфиров может служить косвенным доказательством того, что модификация карбоксильной группы N-ацетиласпартата фосфорилированными сложноэфирными группами не изменяет свойств этого фармакофора и способствует его эффективному транспорту в ЦНС. В то же время образование более прочных химических связей между аминокислотными субстратами и фосфорилированными фрагментами, как в случае N-замещенных и глицеринсодержащих производных медиаторных аминокислот, по всей вероятности, препятствует быстрому расщеплению этих соединений в ЦНС, вследствие чего биологическая активность таких объектов определяется не столько базовой аминокислотой, сколько химическим строением в целом и способностью веществ взаимодействовать с различными ферментативными системами и рецепторами ЦНС без предварительной метаболической активации.

Подводя итог проведенному фармакологическому изучению психотропных эффектов фосфорсодержащих аналогов медиаторных аминокислот, следует сделать вывод о перспективности дальнейшего поиска высокоэффективных психотропных средств среди представленного ряда соединений. Кроме того, полученные в ходе экспериментального изучения наиболее активных веществ данные позволяют надеяться на возможность создания на их основе эффективных лекарственных средств с антидепрессивной и ноотропной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

- Батабан П.М., Максимова О.А., Браваренко Н.П. // Журнал ВИД - 1992. - Т. 42. - Вып. 6. - С. 1208-1220.
- Беспалов А.Ю., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б., Звартау Э.Э. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1994. - № 5. - С. 494-499.
- Беспалов А.Ю., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б., Звартау Э.Э. // Эксперим. клин. фармакол. - 1992. - Т. 55. - № 5. - С. 17-19.
- Беспалов А.Ю., Думнис М.А., Звартау Э.Э., Пиотровский Л.Б. // Патифизиология и фармакология боли. 1-й Конгресс Российской Ассоциации по изучению боли, Москва, 19-21 октября, 1993, С. 133.
- Буркерт У., Эттингджер Н. Молекулярная механика. - М., 1986.
- Григорьев В.В. // ДАН РАН. - 1993. - Т. 330. - С. 646-648.
- Григорьев В.В., Неманова В.А. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1989. - № 9. - С. 299-302.
- Григорьев В.В., Неманова В.А., Рагулин В.В. // ДАН РАН. - 1992. - Т. 326. - С. 742-745.
- Гарлев А.П., Кононов О.В., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б. // Хим.-фарм. журн. - 1990. - № 5. - С. 20-25.
- Госырин В.А., Жоров Б.С. // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. - 1984. - Т. 70. - С. 529-551.
- Годухин О.В. "Модуляция синаптической передачи в мозге". М. Наука. 1987.
- Гринин Е.В., Волкова Т.М., Арсеньева А.С. // Биорг. химия. - 1986. - Т. 14. - С. 883-892.
- Гудашева Т.А., Островская Р.У. // Хим.-фарм. журн. - 1985. - Т. 19. - С. 1322-1329.
- Дамбинова С.А. Нейрорецепторы глутамата. - Л., 1989.
- Корешонков О.Н., Перестенко Н.В., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1992. - № 6. - С. 563-565.
- Ковалев Г.В., Петров В.П., Тюренков Н.Н. // Физиологический журнал. - 1985. - Т. 31. - № 2. - С. 143-148.
- Ковалев Г.В., Рахимов А.Н., Сажин В.А. и др. // Хим.-фарм. журн. - 1990а. - Т. 24. - № 5. - С. 17-20.
- Ковалев Г.В., Сажин В.А., Щербаков А.А. и др. // Тез. докл. VIII Сов.-Итал. симп. по нейронсифармакологии. - Ленинград. - 1990b. - № 28.
- Ковалев Г.Н. // Тез. докл. I-го Росс. съезда фармакологов. Волгоград. 1995.
- Комиссаров П.В. Механизмы химической чувствительности синаптических мембран. - Киев, 1986.
- Корешонков О.Н., Перестенко Н.В., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б. // Хим.-фарм. журн. - 1995а. - Т. 29. - № 8. - С. 3-6.
- Корешонков О.Н., Перестенко Н.В., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б. // Хим.-фарм. журн. - 1995b. - Т. 29. - № 8. - С. 6-8.
- Лебедев В.П. / Руководство по физиологии. Физиология кровообращения. - Л. - 1986. - С. 230-271.
- Магазаник Л.Г., Антонов С.М., Федорова И.М. и др. // Биол. мембраны. - 1986. - Т. 12. - С. 1204-1209.
- Мандельштам Ю.Е. Нейрон и мускула насекомого. - Л., 1983.
- Мишин М.А., Гусева Е.В., Думнис М.А. и др. // Хим.-Фарм. журн. - 1991. - № 4. - С. 24-26.
- Озеров А.А., Брель А.К., Петров В.П., Григорьев П.А. и др. // Хим.-фарм. журн. - 1993. - № 5. - С. 39-42.
- Приходжан А.В., Ковалев Г.Н., Раевский К.С. // Фармакол. и токсикол. - 1987. - № 1. - С. 10-14.
- Петров В.П. // Тез. докл. I-го съезда Российского общества фармакологов, Волгоград, 1995, с. 326.
- Петров В.П., Гурбанов К.Г. // Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов. - 1985. - Т. 37. - Вып. 5. - С. 21-28.
- Пиотровский Л.Б. // Хим.-фарм. журн. - 1987. - С. 773-782.
- Пиотровский Л.Б., Думнис М.А. // Итоги науки и техники ВИНТИИ, Сер. Физиология человека и животных. - 1989. - Т. 36. - С. 112-147.
- Пиотровский Л.Б. // Вестник Российской Академии медицинских наук. - 1992. - № 7. - С. 57-62.
- Пиотровский Л.Б. // Вестник Российской Академии медицинских наук. - 1988. - Т. 51. - № 6. - С. 17-25.
- Пиотровский Л.Б., Думнис М.А. // Фармакол. токсикол. - 1988. - Т. 51. - № 6. - С. 17-25.
- Пиотровский Л.Б., Думнис М.А., Познякова Л.Н. и др. // Журн. орг. химии. - 1988. - Т. 24. - С. 111-116.
- Писаренко О.Н., Новикова Е.Б., Серебрякова Л.Н. // Бюлл. экспер. мед. и биол. - 1985. - Т. 100. - № 9. - С. 280-282.
- Раевский К.С. // Итоги науки и техники ВИНТИИ, Сер. Физиология человека и животных. - 1989. - Т. 36. - С. 148-176.
- Раевский К.С. // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 1990. - № 1. - С. 3-9.
- Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. - М., 1986.
- Рыжов И.В., Лапин И.П., Александрова И.Я., Пиотровский Л.Б. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1988. - № 7. - С. 64-68.
- Сергеев П.В., Шимановский Н.А. Рецепторы физиологически активных веществ. - М., 1987.

- Удинцев П.А., Иванов В.В. // Пат. физиол. и эксп. терапия. - 1984. - Вып. 4. - С. 60-62
- Экклз Дж. Физиология синапсов. - М. - 1966.
- Ammons L.M., Wilcox G.I. // J. Pharmacol. Exper. Ther. - 1987. - Vol. 243. - P. 9-19.
- Ammons L.M., Wilcox G.I. // J. Pharmacol. Exper. Ther. - 1989. - Vol. 248. - P. 1034-1042.
- Abe I., Sugihara H., Nawa H. et al. // J. Biol. Chem. - 1992. - Vol. 267. - P. 13361-13368.
- Adams M.L., Kalicki J.M., Meyer E.R., Cicero T.J. // Life Sci. - 1993. - Vol. 52. - P. PL245-PL249.
- Addae J.I., Stone T.W. // Neurosci. Lett. - 1987. - Vol. 78. - P. 323-327.
- Advokat C., Pellegrin A.I. // Neurosci. Biobehav. Rev. - 1992. - Vol. 16. - P. 13-24.
- Akaike N., Kawai N., Kiskin N.I. et al. // Neurosci. Lett. - 1988. - Vol. 79. - P. 326-330.
- Akoka H., Aston-Jones G. // J. Neurosci. - 1991. - Vol. 11. - P. 3830-3839.
- Akinsola B.C., Weight F.F. // Soc. Neurosci. Abst. - 1995. - Vol. 21. - P. 1815.
- Albers G.W., Saenz R.E., Moses J.A., Choi D.W. // Stroke. - 1991. - Vol. 22. - P. 1075-1077.
- Alexander G.E., Crutcher M.D. // Trends Neurosci. - 1990. - Vol. 13. - P. 266-271.
- Alger B.E., Teyler T.J. // Brain Res. - 1976. - Vol. 110. - P. 463-480.
- Allen C.N., Spencer P.S., Carpenter D.O. // Neuroscience. - 1993. - Vol. 54. - P. 567-574.
- Altshuler R.A., Wenthold R.L., Schwartz A.M. // Brain Res. - 1984. - Vol. 291. - P. 173-178.
- Amalric M., Ouagazzal A., Baumez C., Nicoullon A. // Neurochem. Int. - 1994. - Vol. 25. - P. 123-31.
- Amaral D.G., Ishizuka N., Claiborne B. // In Understanding the Brain Through the Hippocampus. - Amsterdam, 1990. - P. 1-11.
- Anderson W.W., Lewis D.A., Swartzwelder H.S. et al. // Brain Res. - 1987. - Vol. 57. - P. 1-21.
- Andersson T. et al. // Eur. J. Neurosci. // 1990. - Vol. 3. - P. 66-71.
- Ang R.C., Hoop B., Kazemi H. // J. Applied Physiol. - 1992. - Vol. 72. - P. 1480-1487.
- Aniksztejn L., Ben-Ari Y. // Nature. - 1991. - Vol. 349. - P. 67-69.
- Anis N., Berry S., Burton N., Lodge D. // Br. J. Pharmacol. - 1983. - Vol. 73. - P. 565-574.
- Antonov S.M., Dudel J., Franke C. et al. // J. Physiol. (London). - 1989. - Vol. 419. - P. 569-587.
- Antonov S.M., Grishin E.V., Magazanik L.G. et al. // Neurosci. Lett. - 1987. - Vol. 83. - P. 179-184.
- Arai A., Kessler M., Ambro-Singerson J. et al. // Abstr. Soc. Neurosci. - 1994. - Vol. 20. - P. 1511.
- Aram J.A., Martin D., Tomczyk M. et al. // J. Pharmacol. Exper. - 1989. - Vol. 248. - P. 320-328.
- Aram J.A., Lodge D. // J. Neurosci. Methods. - 1988. - Vol. 23. - P. 211-224.
- Aramori L., Nakanishi S. // Neuron, 1992. - Vol. 8. - P. 757-765.
- Aronica E., Nicoletti F., Condorelli D.F., Balazs R. // Neurochem. Res. - 1993. - Vol. 18. - P. 605-612.
- Artola A., Singer W. // Nature (Lond.). - 1987. - Vol. 330. - P. 649-652.
- Ascher P., Nowak L. // J. Physiol. - 1988. - Vol. 399. - P. 247-266.
- Askmark B., Aquilonius S.M., Gillberg P.G. et al. // J. Neurol. Neurosurg. Psych. - 1993. - Vol. 56. - P. 197-200.
- Askmark B., Aquilonius S.M., Gillberg P.G. et al. // J. Neurol. Neurosurg. Psych. - 1993. - Vol. 56. - P. 197-200.
- Auer R.N. // Psychopharmacol. Bull. - 1994. - Vol. 30. - P. 585-592.
- Auer R.N., Coulter K.C. // Acta Neuropathol. - 1994. - Vol. 87. - P. 1-7.
- Ault B., Evans R.H., Francis A.S. et al. // J. Physiol. - 1980. - Vol. 307. - P. 413-428.
- Backonja M., Arndt G., Gombor K.A. et al. // Pain. - 1994. - Vol. 56. - P. 51-57.
- Ball-E.F., Shaw P.J., Ince P.G., Johnson M. // Brain Res. - 1994. - Vol. 658. - P. 209-218.
- Balster R.L. // Comparative Perception / Eds. M.A. Berkley, W.C. Stebbins - NY, 1990. - P. 127-154.
- Balster R.L. // Drug Discrimination: Applications to Drug Abuse Research / Eds. R.A. Glennon, T.U.C. Jarbe, J. Frankenhelm - NIDA Research Monograph Series - 1993. - Vol. 116. - P. 163-180.
- Balster R.L., Grech D.M., Bobelis D.J. // Eur. J. Pharmacol. - 1992. - Vol. 222. - P. 39-42.
- Balster R.L., Johanson C.E., Harris R.T., Schuster C.R. // Pharmacol. Biochem. Behav. - 1973. - Vol. 1. - P. 167-172.
- Balster R.L., Nicholson K.L., Sanger D.J. // Drug Alcohol Depend. - 1994. - Vol. 35. - P. 211-216.
- Balster R.L., Willetts J. // Handbook of Experimental Pharmacology. / Eds. C.R. Schuster, S.W. Gust, M.J. Kuhar, Berlin, 1995. - Vol. 118.
- Baran H., Loscher W., Mevissen M. // Brain Res. - 1994. - Vol. 652. - P. 195-200.
- Bardgett M.E., Wrona C.T., Newcomer J.W. et al. // Eur. J. Pharmacol. - 1993. - Vol. 230. - P. 245-250.
- Barks J.D., Silverstein F.S. // Mol. Chem. Neuropathol. - 1994. - Vol. 23. - P. 201-215.
- Barrionuevo G., Kelso S.R., Johnston D. et al. // J. Neurophysiol. - 1986. - Vol. 55. - P. 540-550.
- Bashir Z.I., Bortolotto Z.A., Davies C.H. et al. // Nature. - 1993. - Vol. 363. - P. 347-350.
- Baskys A., Malenka R.C. // J. Physiol. (Lond.). - 1991. - Vol. 444. - P. 687-701.
- Baudry M., Evans J., Lynch G. // Nature. - 1986. - Vol. 319. - P. 329-331.

- Baxter D., Bittner G.D., Brown T.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1985. - Vol. 82. - P. 5978-5982.
- Beal M.F. // *Ann. Neurol.* - 1992. - Vol. 31. - P. 119-130.
- Beal M.F., Hyman B.T., Koroshetz W. // *Trends Neurosci.* - 1993. - Vol. 16. - P. 125-131.
- Beal M.F., Kowall N.W., Ellison D.W. et al. // *Nature*. - 1986. - Vol. 321. - P. 168-172.
- Beal M.F., Kowall N.W., Swartz K.J. et al. // *J. Neurosci.* - 1988. - Vol. 8. - P. 3901-3908.
- Beardsley P. M., Hayes B.A., Balster R.L.J. // *Pharmacol. Exper. Ther.* - 1990. - Vol. 252. - P. 953-959.
- Behbehani M.M., Fields H.L. // *Brain Res.* - 1979. - Vol. 170. - P. 85-93.
- Behnisch T., Reymann K.G. // *Neuroscience*. - 1993. - Vol. 54. - P. 37-47.
- Belcher G., Ryall R.W. // *Brain Res.* - 1978. - Vol. 145. - P. 303-314.
- Bell E.A., Donovan J. P. // *Phytochemistry*. - 1966. - Vol. 5. - P. 1211-1219.
- Belozertseva I.V., Zvartau E.E., Bessalov A.Yu. // *Life Sci.* - 1995. - Vol. 58. - P. PL55-62.
- Ben-Eliyahu S., Marek P., Vaccarino A.L. et al. // *Brain Res.* - 1991. - Vol. 575. - P. 304-308.
- Bennett D.A., Amrick C.L. // *Life Sci.* - 1986. - Vol. 39. - P. 2455-2461.
- Bennett D.A., Amrick C.L. // *Excitatory Amino Acid Transmission* / Eds. T.P. Hicks, D. Lodge, H. McLennan. - New York, 1990. - P. 213-216.
- Bennett D.A., Bernard P. S., Amrick C.L. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989. - Vol. 250. - P. 454-460.
- Bennett D.A., Lehmann J., Bernard P. S. et al. // *Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety, and Stroke Therapy* / Eds. B.S. Meldrum, M. Williams. - NY, 1990. - P. 519-524.
- Bennett G.J. // *Textbook of Pain*. / Eds. P. D. Wall, R. Melzack. - Edinburgh, 1994b. - P. 201-222.
- Bennett G.J. // *Progress in Pain Research and Management*. / Eds. G.B. Gebhart, D.L. Hammond, T.S. Jensen. - Seattle, 1994a. - Vol. 2. - P. 495-510.
- Bennett J. A., Dingledine R. // *Neuron*, 1995. - Vol. 14. - P. 373-84.
- Bensimon G., Lacomblez L., Meininger V. // *ALS/Riluzole Study group, New Eng. J. Med.*, 1994. - Vol. 330. - P. 585-591.
- Benveniste M.J., Leander J. D., Ornstein P. L. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1993. - Vol. 19. - P. 293.
- Berger S.W., Fiscus R.R., Ruth P. et al. // *J. Neurochem.* - 1995. - Vol. 64. - P. 2087-2096.
- Berry S.C., Dawkins S.L., Lodge D. // *Br. J. Pharmacol.* - 1984. - Vol. 83. - P. 179-185.
- Bessalov A.Yu., Beardsley P. M., Balster R.L. // *Paper presented at 58th CPDD Meeting, June 22-27. - 1996. - San Juan, Puerto-Rico.*
- Bessalov A.Yu., Dumpis M.A., Piotrovsky L.B., Zvartau E.E. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 264. - P. 233-239.
- Bessalov A.Yu., Dumpis M.A., Piotrovsky L.B., Zvartau E.E. // *Pharmacol. Commun.* - 1994. - Vol. 4. - P. 46-53.
- Bessalov A.Yu., Zvartau E.E. // *Eur. Neuropsychopharmacology*. - 1995. - Vol. 5. - P. 89-93.
- Bhargava H.N. // *Gen. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 26. - P. 1055-1060.
- Bhargava H.N., Matwiyshyn G.A. // *Pharmacology*. - 1993. - Vol. 47. - P. 344-350.
- Bhargava H.N., Reddy P. L., Gudehithlu K.P. // *Gen. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 26. - P. 131-136.
- Bhargava H.N., Thorat S.N. // *Brain Res.* - 1994. - Vol. 649. - P. 111-116.
- Bigge C.F., Humblet C., Johnson G. et al. // *Trends in Medicinal Chemistry'90*. / Eds. Sarel S., Mechoulam R., Agranat I. - London, 1992. - P. 153-160.
- Bingman P. V., Bagnoli P., Ioale P. et al. // *Neurol. Neurobiol.* - 1989. - Vol. 52. - P. 379-394.
- Birch P. J., Grossman C.J., Hayes A.C. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 156. - P. 177-179.
- Birse E.F., Eaton S.A., Jane D.E. et al. // *Neuroscience*. - 1993. - Vol. 52. - P. 481.
- Biscoe T.J., Davies J., Dray A. et al. // *Brain Res.* - 1977. - Vol. 148. - P. 543-548.
- Blackley P. T.H., Bell D.R., Choi S.-K. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 266. - P. 1573-1580.
- Blackley P. T.H., Bell D.R., Choi S.-K. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 266. - P. 1573-1580.
- Blessing W.W. // *J. Physiol.* - 1993. - Vol. 416. - P. 67-68.
- Bochet P., Rossier J. // *EXS*. - 1993. - Vol. 63. - P. 224-233.
- Bogerts B. // *Schizophrenia Bull.* - 1993. - Vol. 19. - P. 431-445.
- Bolhuis J. J., Reid I.C. // *Behav. Brain Res.* - 1992. - Vol. 47. - P. 151-157.
- Bonucelli U., Del Dotto P., Piccini P. et al. // *Lancet*. - 1992. - Vol. 340. - P. 53.
- Bossier J. R., Simon P., Aron C. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1968. - Vol. 4. - P. 145-151.
- Bouyer J. J., Park D.H., Joh T.H. et al. // *Brain Res.* - 1984. - Vol. 302. - P. 267-275.
- Bowen D.M., Francis P. T., Pangalos M.N. et al. // *Lancet*. - 1992. - Vol. 339. - P. 132-133.
- Bowery N.G., Hudson A.L., Price W. // *Neuroscience*. - 1987. - Vol. 20. - P. 365-383.
- Braak H., Braak E., Bohl J. // *Eur. Neurol.* - 1993. - Vol. 33. - P. 403-408.

- Brackley P. T.H., Bell D.R., Choi S.-K. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 266. - P. 1573-1580.
- Bradford H.F., Young A.M.J., Crowder J. M. // *Neurosci. Lett.* - 1987. - Vol. 81. - P. 296-302.
- Braun D.W. // *Neuroendocrinology*. - 1995. - Vol. 61. - P. 213-225.
- Braun D.W., Mahesh V.B. // *Front. Neuroendocrinol.* - 1994. - Vol. 15. - P. 3-49.
- Brehm L., Jorgensen F.S., Hansen J. J., Krosgaard-Larsen P. // *Drug News Persp.* - 1988. - Vol. 1. - P. 138-144.
- Brent P. J., Chahl L.A. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* - 1993. - Vol. 3. - P. 23-32.
- Bridges R.S., Stevens D.R., Kahle L.S. et al. // *J. Neurosci.* - 1989. - Vol. 9. - P. 2073-2079.
- Bristow D.R., Bowery N.G., Woodruff G.N. // *Eur. J. Pharm.* - 1986. - Vol. 126. - P. 303-308.
- Brorson J. R., Manzillo P. A., Miller R.J. // *J. Neurosci.* - 1994. - Vol. 14. - P. 187-97.
- Buhser M., Kieseberg U., Notz P. K., Schmidt W.J. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 229. - P. 75-82.
- Buffalo E.A., Gillam M.P., Allen R.R. et al. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1994. - Vol. 48. - P. 935-940.
- Buller A.L., Larson H.C., Morrisett R.A., Monaghan D.T. // *Mol. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 48. - P. 717-723.
- Butelman E.B. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1990. - Vol. 35. - P. 533-536.
- Byas-Smith M.G., May M.B., Gracely R.H., Bennett G.J. // 7th World Congress on Pain, IASP Publ., Seattle, W.A. 1993. - P. 454.
- Cahusac P. B.M. et al. // *Neuropharmacology*. - 1984. - Vol. 123. - P. 719-724.
- Cain D.P. // *Exper. Neurol.* - 1988. - Vol. 100. - P. 179-187.
- Cain D.P. // *Trends Neurosci.* - 1989. - Vol. 12. - P. 6-10.
- Camphrino J. A., Herting R.L. // *Psychopharmacology*. - 1994. - Vol. 115. - P. 46-52.
- Canhuo P., Mendonca A., Ribeiro J. A. // *Brain Res.* - 1994. - Vol. 661. - P. 265-273.
- Cappendijk S.L., de Vries R., Dzoljic M.R. // *Neuropsychopharmacology*. - 1993. - Vol. 3. - P. 111-116.
- Carlsson A., Carlsson M., Svensson A. // *Biological Psychiatry* - 1991. - Vol. 2. - P. 751-753.
- Carlsson H., Ronne-Engstrom E., Ungerstedt U. // *Neurosci. Lett.* - 1992. - Vol. 140. - P. 30-32.
- Carlsson M., Carlsson A. // *J. Neural Transm.* - 1989. - Vol. 77. - P. 65-71.
- Carter C., Benavides J., Legendre P., Vincent J. D. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. - Vol. 247. - P. 1222-1232.
- Carter C., Rivy J.-P., Scatton B. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 164. - P. 611-612.
- Cartmell J., Curtis A.R., Kemp J. A. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1993. - Vol. 153. - P. 107-110.
- Cerne R., Jiang M., Randic M. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 596. - P. 111-123.
- Chait L.D., Wenger G.R., McMillan D.E. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1981. - Vol. 15. - P. 145-148.
- Chalmers J., Pilowsky P. // *J. of Hypertension*. - 1991. - Vol. 9. - P. 675-694.
- Chapman A.G. // *Excitatory Amino Acid Antagonists*. - Oxford, 1991. - P. 265-286.
- Chapman A.G., Collins J. F., Meldrum B.S., Westerburg E. // *Neurosci. Lett.* - 1983. - Vol. 37. - P. 75-80.
- Chapman A.G., Meldrum S.M. // *Biochem. Soc. Transactions*. - 1993. - P. 106-110.
- Chapman V., Dickenson A.H. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 573. - P. 321-323.
- Chapman V., Dickenson A.H. // *Brit. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 105. - P. 138P.
- Chen Q.X., Wong R.K. // *J. Physiol., Lond.* - 1995. - Vol. 482. - P. 353-362.
- Chen W., Rohn G., Meese C.O. et al. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 453. - P. 9-16.
- Cheney D.L., Wood P. L. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. Vol. 246 - P. 65-75.
- Chevalier G., Deniau J. M. // *Trends Neurosci.* - 1990. - Vol. 13. - P. 277-280.
- Chizimakov I.V., Kiskin N.I., Tsyndrenko A.Ya., Krishtal O.A. // *Neurosci. Lett.* - 1990. - Vol. 108. - P. 88-92.
- Christensen I.T., Ebert B., Madsen U. et al. // *J. Med. Chem.* - 1992. - Vol. 35. - P. 3512-3519.
- Chronopoulos A., Stafstrom C., Thurber S. et al. // *Epilepsia*. - 1993. - Vol. 34. - P. 359-366.
- Clements J. D. // *Trends Neurosci.* - 1996. - Vol. 19. - P. 163-171.
- Cline H., Debski E.A., Constantine-Paton M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1987. - Vol. 84. - P. 4342-4345.
- Clineschmidt B.V., Martin G.E., Bunting P. R. // *Drug Dev. Res.* - 1982a. - Vol. 2. - P. 123-124.
- Clineschmidt B.V., Martin G.E., Bunting P. R., Papp N.I. // *Drug Dev. Res.* - 1982b. - Vol. 2. - P. 135-145.
- Clineschmidt B.V., Williams M., Witoslawski J. J. et al. // *Drug Dev. Res.* - 1982c. - Vol. 2. - P. 147-163.
- Coan E.J., Collingridge G.L. // *J. Physiol. Lond.* - 1988. - Vol. 406. - P. 71.
- Cochran S.L., Kasik P., Precht W. // *Synapse*. - 1987. - Vol. 1. - P. 102-123.
- Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L., Melzack R. // *Pain*, 1993, Vol. 52. - P. 259-285.
- Coderre T.J., Van-Empel I. // *Pain*, 1994a. - Vol. 59. - P. 345-352.
- Coderre T.J., Van-Empel I. // *Pain*, 1994b. - Vol. 59. - P. 353-359.
- Collingridge G.L. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1985. - Vol. 6. - P. 407-411.
- Collingridge G.L., Bliss T.V.P. // *Trends Neurosci.* - 1988. - Vol. 10. - P. 288-293.
- Collingridge G.L., Davies S.N. // *J. Physiol., Lond.* - 1989a. - Vol. 412. - P. 28.
- Collingridge G.L., Davis J. // *Brain Res.* - 1981. - Vol. 212. - P. 345-359.

- Collingridge G.L., Davis J. // *Neuropharm.* - 1989. - Vol. 18. - P. 193-199.
- Collingridge G.L., Kehl S.J., McLennan H. // *J. Physiol., Lond.* - 1983. - Vol. 334. - P. 33-46.
- Collingridge G.L., Lester R.A.I. // *Pharmacol. Rev.* - 1989. - Vol. 41. - P. 143-210.
- Collins G.G.S. // *Brain Res.* 1982. - Vol. 244. - P. 311-318.
- Colombo P. J., Davis H.P., Simolke N. et al. // *Bull. Psychonomic Soc.* - 1988. - Vol. 26. - P. 375-377.
- Conn P. J. // *Neuropsychopharmacology* - 1994. - Vol. 10. - N 3S. - part 1. - P. 621.
- Consolo S., Salmoiraghi P., Amoroso D., Kolasa K. // *J. Neurochem.* - 1990. - Vol. 54. - P. 571-577.
- Coogan M., Larson J., Rogers G., Lynch G. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1994. Vol. 20. - P. 1512.
- Cook L., Davidson A.B. // *The Benzodiazepines.* / Eds S. Garattini, E. Mussini, L.O. Randall, New York, 1973. - P. 327-345.
- Copani A., Canonico P. L., Catania M.V. et al. // *Brain Res.* - 1991. - Vol. 558. - P. 79-86.
- Corbett D., Evans S., Thomas C. et al. // *Neurol. Neurobiol.* 1990. - Vol. 514. - P. 300-304.
- Corso T., Neafsey E.L., Collins M. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1994. - Vol. 20. - P. 1531.
- Cotman C.W., Monaghan D.T. // *Neurol. Neurobiol.* - 1987. - Vol. 24. - P. 317-324.
- Cotman C.W., Flatman J. A., Ganong A.H., Perkins M.A. // *J. Physiol.* - 1986. - Vol. 378. - P. 403-425.
- Cotman C.W., Iversen L.L. // *Trends Neurosci.* - 1987. - Vol. 10. - P. 263-265.
- Cotman C.W., Monaghan D.T., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. // *Trends Neurosci.* - 1987. - Vol. 10. - P. 273-280.
- Cotterell K.L., Croucher M.J., Bradford H.F. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 214. - P. 285-287.
- Croucher M.J., Collins J. F., Meldrum B.S. // *Science.* - 1982. - Vol. 216. - P. 899-901.
- Croucher M.J., Cotterell K.L., Bradford H.F. // *Neurochem. Res.* - 1992. - Vol. 17. - P. 409-413.
- Crumelly V., Fonda S., Collingridge G.L. et al. // *Nature* - 1982. - Vol. 300. - P. 450-452.
- Cunningham M.D., Ferkany J. W., Enna S.J. // *Life Sciences.* - 1994. - Vol. 54. - P. 135-148.
- Curatolo A., Marchetti E., Brancati A., Saleo A. // *Arch. Sci. Biol.* - 1967. - Vol. 51. - P. 98-103.
- Curtis D.R. // *Glutamic Acid. Adv. Biochem. and Physiol.* / Eds L.J. Filer et al. New York. - 1979. - P. 163-175.
- Curtis D.R., Phillis J. W., Watkins J. C. // *J. Physiol.* - 1960. - Vol. 150. - P. 656-682.
- Curtis D.R., Phillis J. W., Watkins J. C. // *Nature.* - 1959. - Vol. 183. - P. 611-612.
- Curtis D.R., Watkins J. C. // *J. Neurochem.* - 1960. - Vol. 6. - P. 117-141.
- Dale N. // *J. Neurosci.* - 1986. - Vol. 6. - P. 2662-2675.
- Dale N., Roberts A. // *J. Physiol. (Lond.)* - 1991. - Vol. 363. - P. 35-59.
- Dampney R.A.L., Sasaki S. // *Clinical and Experimental Pharmacol. and Physiol.* - 1991. V.18. - P. 97-101.
- Damsma G., Tham C.S., Robertson G.S., Fibiger H.C. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 186. - P. 335-338.
- Danyez W., Zajackowski W., Parsons C.G. // *Behav. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 6. - P. 455-474.
- Danyesz W., Essman U., Bresink I., Wilke R. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1994. - Vol. 48. - P. 111-118.
- Danyesz W., Fadda E., Wroblewski J. T., Costa E. // *Mol. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 86. - P. 912-916.
- Danyesz W., Wroblewski J. T., Brooker G., Costa E. // *Brain Res.* - 1989. - Vol. 479. - P. 270-276.
- Davies J., Evans R.H., Francis A.A. et al. // *J. Neurochem.* - 1981. - Vol. 36. - P. 1305-1307.
- Davies J., Watkins J.T. // *Brain Res.* - 1982. - Vol. 235. - P. 378-386.
- Davies J., Watkins J. C. // *Exp. Brain Res.* - 1983. - Vol. 49. - P. 280-290.
- Davies J., Watkins J. C. // *J. Physiol.* - 1979. - Vol. 297. - P. 621-625.
- Davies S.N. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 145. - P. 141-151.
- Davies S.N., Lodge D. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 424. - P. 402-406.
- Davis H.P., Tribuna J., Pulsinelli W.A. et al. // *Physiol. Behav.* - 1986. - Vol. 37. - P. 387-392.
- Davis S., Butcher S.P., Morris R.G.M. // *Neurosci.* - 1992. - Vol. 12. - P. 21-34.
- Daw N.W., Stein P. S.G. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1993. - Vol. 16. - P. 207-222.
- Daw N.W. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1993. - Vol. 16. - P. 207-222.
- Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1991. Vol. 88. - P. 6368-6371.
- De Belleruche J., Recordati A., Rose F.C. // *Neurochem. Pathol.* - 1984. - Vol. 2. - P. 1-6.
- Deakin J. F., Slater M.D., Simpson A.C. et al. // *J. Neurochem.* - 1989. - Vol. 52. - P. 1781-1786.
- DeLander G.E., Wahl J.J. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989. - Vol. 251. - P. 1090-1095.
- DeLander G.E., Wahl J.J. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1991. - Vol. 39. - P. 155-159.
- DeNoble V.J., Jones K.W., Schaeffer C.L. et al. // *Pharmacology.* - 1990. - Vol. 175. - P. 197-202.
- Di Chiara G., Morelli M. // *Adv. Neurol.* - 1993. - Vol. 60. - P. 102-106.
- Dickenson A.H. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1990. - Vol. 11. - P. 307-309.
- Dickenson A.H., Lalley P. M., Saum W.R. // *Neuropharmacol.* - 1987. - Vol. 26. - P. 1235-1238.
- Dickenson A.H., Aydar E. // *Neurosci. Lett.* - 1991. - Vol. 121. - P. 263.
- Dickenson A.H., Sullivan A.F. // *Brain Res.* - 1990. - Vol. 506. - P. 31-39.

- Dickenson A.H., Sullivan A.F. // *Neuropharmacology*. - 1987. - Vol. 26. - P. 1235-1238.
- Dickenson A.H., Sullivan A.F. // *Pain*. - 1991. - Vol. 46. - P. 344-345.
- Dingledine R., McBain C.J., McNamara J. O. // *Trends Pharmacol. Sci. Special Report* - 1991. - P. 46-53.
- Ditzler K. // *Arzneimittelforschung* - 1991. - Vol. 8. - P. 773-780.
- Dodhukin O.V., Zharikova A.D., Budantsev A.Y. // *Neuroscience*. - 1984. - Vol. 12. - P. 377-383.
- Dolphin A.C. // *Neuroscience*. - 1993. - Vol. 10. - P. 377-383.
- Donaldson J., St.Pierre T., Minnich J.L., Barbean A. // *Canad. J Biochem.* - 1973. - Vol. 51. P. 87-92.
- Donevan S.D., Rogawski M.A. // *Neuron*. - 1993. - Vol. 10. - P. 51-59.
- Dorville A., McCort-Tranchepain I., Vichard D. et al. // *J. Med. Chem.* - 1992. - Vol. 35. - P. 2551-2562.
- Dostrovsky J. O., Pomeranz B. // *Exper. Neurol* - 1976. - Vol. 52. - P. 325-338.
- Dougherty P. M., Willis W.D. // *Pain*. - 1991. - Vol. 47. - P. 85-93.
- Dougherty P. M., Willis W.D. // *J. Neurosci.* - 1992. - Vol. 12. - P. 883-894.
- Douglas R.M. // *Brain Res.* - 1977. - Vol. 126. - P. 361-365.
- Drejer J., Larson O.M., Schoushoe A. // *Exp. Brain Res.* - 1982. - Vol. 47. - P. 259-269.
- Drejer J., Nielsen E.O., Honore T., Sheardown M. // *Neurosci. Lett.* - 1989. - Vol. 98. - P. 333-338.
- Druhan J. P., Jakob A., Stewart J. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. Vol. 243. - P. 73-77.
- Dunn R.W., Corbett R., Fielding S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 169. - P. 1-10.
- Dure L.S. 4th, Young A.B., Penney J. B. Jr. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 1992. - Vol. 89. - P. 7688-7692.
- Duval D., Roome N., Gauffeny C. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1992. - Vol. 137. - P. 193-197.
- Eaton S.A., Birse E.F., Wharton B. et al. // *Eur. J. Neurosci.* - 1993. - Vol. 5. - P. 186-189.
- Eide P. K., Jorum E., Stubhaug A. et al. // *Pain*. - 1994. - Vol. 58. - P. 347-354.
- Eisen A., Stewart H., Schulzer M., Cameron D. // *Can. J. Neurol. Sci.* - 1993. - Vol. 20. - P. 297-301.
- Eisenberg E., Vos B.P., Strassman A.M. // *Pain*. - 1993. - Vol. 54. - P. 301-307.
- Elliott K., Hyansky A., Iuturisi C.E. // *Pain*. - 1994. 59. - P. 361-368.
- Elliott K., Minami N., Kolesnikov Y.A. et al. // *Pain*. - 1994. - Vol. 56. - P. 69-75.
- Ellison G. // *Neuroreport*. - 1994. - Vol. 5. - P. 2688-2692.
- Emre M. // *Seizure*. - 1993. - Vol. 1(Suppl. A). - S6/4.
- Engberg I., Flatman J. A., Lambert J. D.C. // *J. Physiol.* - 1979. - Vol. 288. - P. 227-261.
- Enomoto R., Ogita K., Han D., Yoneda Y. // *Neurosci. Res.* - 1993. - Vol. 16. - P. 217-24.
- Erdo S.L. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1991. - Vol. 12. - P. 426-429.
- Errington M.L., Lynch M.A., Bliss T.V.P. // *Neuroscience*. - 1987. - Vol. 20. - P. 279-284.
- Evans R.H., Francis A.A., Watkins J. C. // *Experientia (Basel)*. - 1977. - Vol. 33. - P. 489-491.
- Evans R.H., Evans S.J., Pook P. C., Sumter D.C. // *Br. J. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 91. - P. 531-537.
- Evans R.H., Watkins J. C. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1978. - Vol. 50. - P. 123-129.
- Fagg G.E. // *Trends Neurosci.* - 1985. - Vol. 8. - P. 207-210.
- Fagg G.E., Foster A.C. // *Neurosci.* - 1983. - Vol. 9. - P. 701-719.
- Fagg G.E., Baud J., Hall R., Dingwall J. // *In Frontiers in Excitatory Amino Acid Research*, Alan R. Liss - 1988. - P. 59-66.
- Farb C.R., Aoki C., Ledoux J. E. // *J. Comp. Neurol.* - 1995. - Vol. 362. - P. 86-108.
- Farrant M., Feldmeyer D., Takahashi T., Cull-Candy S.G. // *Nature*. - 1994. - Vol. 368. - P. 335-339.
- Felsby S., Nielsen J., Arendt-Nielsen L., Jensen T.S. // *Pain*. - 1996. - Vol. 64. - P. 283-291.
- Fercany J. W., Zivkovic B. // *J. Psychopharmacol.* - 1989. - Vol. 3. - P. 198-204.
- Ferkany J., Coyle J.T. // *J. Neurosci. Res.* - 1986. Vol. 16. P. 491.
- Ferkany J. W., Hamilton G.S., Patch R.J. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 264. - P. 256-64.
- Ferrante R.J., Kowall N.W., Cipolloni P. B. et al. // *Exper. Neurol* - 1993. - Vol. 119. - P. 46-71.
- French-Mullen J. M., Koller K., Zaczek R. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1985. - Vol. 82. - P. 3897-3900.
- Fikse E.M., Fonnum F. // *Biochem. J.* - 1991. - Vol. 276. - P. 363.
- File S.E. // *J. Neurosci. Methods*. - 1980. - Vol. 2. - P. 219-238.
- File S.E., Fernandez C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1994. - Vol. 47. - P. 823-826.
- Filloux F., Liu T.J., Hsu C.Y. et al. // *Synapse*. - 1988. - Vol. 2. - P. 521-531.
- Fisher R.S., Cysyk B.J., Lesser R.P. et al. // *Neurology*. - 1990a - Vol. 40. - P. 547-549.
- Fisher R., Johnston D. J. // *Neurophysiol.* - 1990b. - Vol. 64. - P. 1291-1302.
- Fix A.S., Horn J. W., Wightman K.A. et al. // *Exper. Neurol* - 1993. - Vol. 123. - P. 204-215.
- Flatman J. A., Schwandt P. C., Crill W.E., Stafstrom C.E. // *Brain Res.* - 1983. - Vol. 266. - P. 169-173.
- Fletcher E.J., Lodge D. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 151. - P. 161-162.
- Folstein S.E. J. // *Hopkins Univ. Press, Baltimore*. - 1989. - P. 77.
- Fonnum F. // *J. Neurochem.* - 1984. - Vol. 42. - P. 1-11.

- Foster A.C., Fagg G.E. // *Brain Res. Rev.* - 1984. - Vol. 7. - P. 103-164.
- Foster A.C., Gill R., Kemp J. A., Woodruff G.N. // *Neurosci. Lett.* - 1987. - Vol. 76. - P. 307-311
- Foster A.C., Gill R., Woodruff G.N. // *J. Neurosci.* - 1988. - Vol. 8. - P. 4745-4754
- Fontz A.S., Champagnat J., Denavit-Saubie M. // *Neurosci. Lett.* - 1988. - Vol. 87. - P. 221-226
- Francis P. T., Sinis N.R., Procter A.W., Bowen D.M // *J. Neurochem.* - 1993. - Vol. 60. - P. 1589-1604
- Freed W.J., Braun D.E. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 459. P. 157-162.
- Freed W.J. // *J. Pharm. Biochem. Behav.* 1989. - Vol. 32. P. 337-345.
- Freed W.J., Dillon-Carter O., Kleinman J. E. // *Exper. Neurol* 1993. - Vol. 121. - P. 48-56.
- Freed W.J., Wyatt R.J. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1981. - Vol. 14. - P. 223-226.
- Frey P., Berney D., Mueller W. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1988. - Vol. 91. - P. 194-198.
- Fundytus M.E., Coderre T.J. // *Br. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 113. - P. 1215-1220.
- Fushiya S., Gu Q.-Q., Ishikawa K. et al. // *Chem. Pharm. Bull.* - 1993. - Vol. 41. - P. 484-486
- Gabellini N., Manev R.M., Candeo P. et al. // *Neuroreport.* - 1993. - Vol. 4. - P. 531-534.
- Ganong A.H., Cotman C.W., Jones A.W., Watkins J. C. // *J. Neurosci.* - 1986. - Vol. 6. - P. 930-937.
- Gardette R., Crepel F. / *Serotonin. The Cerebellum and Ataxia.* Raven Press. NY. - 1993. - P. 225-236.
- Gardner C.R // *J. Pharmacol. Methods.* - 1985. - Vol. 14. - P. 181-187.
- Garthwaite G., Garthwaite J. // *Neurosci. Lett.* - 1989. - Vol. 99. - P. 113-118.
- Garthwaite J. // *Br. J. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 85. - P. 297-307.
- Garthwaite J. // *J. Physiol. (Lond.).* - 1986. - Vol. 371. - P. 16
- Garthwaite J. // *Trends Neurosci.* - 1991. - Vol. 14. - P. 60-67
- Garyaev A.P., Piotrovsky L.B., Poznyakova L.N. // *Neurosci. Lett.* - 1991. - Vol. 125. - P. 227-230.
- Gean P.-W., Chang F.-C., Huang C.C. et al. // *Brain Res. Bull.* - 1993. - Vol. 31. - P. 7-11.
- Gelbard H.A., Dzenko K.A., DiLoreto D. et al. // *Dev. Neurosci.* - 1993. - Vol. 15. - P. 417-422.
- Gerhardt S.C., Boast C.A. *Behav. // Neurosci.* - 1988. - Vol. 102. - P. 301-303.
- Gill R., Hargreaves R.J., Kemp J. A // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 1995. - Vol. 15. - P. 197-204.
- Glaum S.R., Slater N.T., Rossi D.J. et al. // *J. Neurophysiol.* - 1992. - Vol. 68. - P. 1453-1462.
- Glowa J. R., Barrett J. E. // *Science.* - 1983. - Vol. 220. - P. 333-335.
- Goddard G.V., McIntyre D.C., Leech C.K. // *Exper. Neurol* - 1969. - Vol. 25. - P. 295-330.
- Gold M.S., Morgan M.M., Liebeskind J. C. // *Pain.* - 1990. - Vol. 5. - P. 441.
- Goldberg M.E., Salama A.I., Patel J. B., Malick J. B. // *Neuropharmacology.* - 1983. - Vol. 22. - P. 1499-1504.
- Goodwin D.W., Guze S.B. // *Oxford Univ. Press. NY.* - 1989. - P. 123.
- Gordon F.J. // *Clin. Exper. Hypertens.* - 1995. - Vol. 17. - P. 81-90.
- Gorelick D.A., Balster R.L., / *Psychopharmacology. - The Fourth Generation of Progress / Eds. F.E. Bloom, D.J. Kupfer.* New York. - 1995. - P. 1767-1776.
- Gottfries C.G. // *Br. J. Clin. Pract.* - 1994. - Vol. 48. - P. 327-330.
- Gotti B., Duberger D., Bertin J. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. - Vol. 247. - P. 1211-1221.
- Graham S.H., Chen J., Sharp F.R. et al. // *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism.* - 1993. - Vol. 13. - P. 88-97.
- Granger R., Staubli U., Davis M. et al. // *Synapse.* - 1993. - Vol. 15. - P. 326-329.
- Grech D.M., Willetts J., Balster R.L. // *Neuropharmacology.* - 1993. - Vol. 32. - P. 349-354.
- Greenamyre J. T., Maragos E.F., Albin R.L. et al. // *Progr. NeuroPsychopharmacol. Biol. Psych.* - 1988. - Vol. 12. - P. 421-430.
- Greenamyre J. T., Porter R.H. // *Neurology.* - 1994. - Vol. 4 (Suppl 8). - P. S7-13
- Greenamyre J. T., Young A.B., Penney J. B // *J. Neurosci.* - 1984 - Vol. 4. - P. 2133-2144
- Greenmayere J. T., Penney J. B., D'Amato et al. // *J. Neurochem.* - 1987. - Vol. 48. - P. 543-551.
- Griffith W.H. // *J. Neurophysiol.* - 1990. - Vol. 63. - P. 491-501.
- Grillner S., Wallen P., Dale N. et al // *Trends Neurosci.* - 1987. - Vol. 10. - P. 34-41.
- Grimwood S., Wilde G.J., Foster A.C. // *J. Neurochem.* - 1993. - Vol. 60. - P. 1729-1738
- Grishin E.V., Volkova T.M., Arsenieva A.S. // *Toxicon.* - 1989. - Vol. 27. - P. 541-549.
- Grover L.M., Teyler T.J. // *Brain Res.* - 1990. - Vol. 506. - P. 53-61.
- Gu Q., Beer M.F., Singer W. // *Dev. Brain Res.* - 1989. - Vol. 47. - P. 281-288
- Gumaraes F.S., Carobrez A.P., De Aguiar J. C., Graeff F.G. // *Psychopharmacology.* - 1991 - Vol. 103. - P. 91-94.
- Gundersen C.B., Miledi R., Parker I. // *Proc. R Soc. London.* - 1984 - Vol. 221B - P. 127-143.
- Gutstein H.B., Trujillo K.A. // *Brain Res.* - 1993 - Vol. 626. - P. 332-334.
- Guyenet P. G., Filtz T.M., Donaldson S.R. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 407. - P. 272-284.
- Haglid K.G., Wang S., Qiner Y., Hamberger A. // *Mol. Neurobiol.* - 1994. - Vol. 9. - P. 259-263.
- Haldeman S., Huffman R.D., Marshall K.C. // *Brain Res.* - 1972. - Vol. 39. - P. 419-425.

- Haley J. E., Sullivan A.F., Dickenson A.H. // *Brain Res.* - 1990. - Vol. 518. - P. 218-226.
- Halpain S., Girault J.-A., Greengard P. // *Nature.* - 1990. - Vol. 343. - P. 369-372.
- Hamberger A.C., Chiang G.H., Nysten E.S. et al. // *Brain Res.* - 1979. - Vol. 168. - P. 513-530.
- Handelmann G.E., Olton D.S. // *Brain Res.* - 1981. - Vol. 217. - P. 41-58.
- Hargreaves R.J., Rigby M., Smith D., Hill R.G. // *Br. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 110. - P. 36-42.
- Harris E.W., Cotman C.W. // *Neurosci. Lett.* - 1986. - Vol. 70. - P. 132-137.
- Harrison F.L., Nunn P. B., Hill R.R. // *Phytochemistry.* - 1977. - Vol. 16. - P. 1211-1215.
- Harrison N.L., Simmonds M.A. // *Br. J. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 84. - P. 381-391.
- Hattori T., Fibiger H.C. // *Brain Res.* - 1982. - Vol. 238. - P. 245-256.
- Hayashi T. // *Jpn. J. Physiol.* - 1952. - Vol. 3. - P. 46-64.
- Hayashi Y., Momigama A., Takahashi T. et al. // *Nature* - 1993. - Vol. 366. - P. 687-690.
- Hayashi Y., Tanabe Y., Aramori I. et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 107. - P. 539-543.
- Headley P. M., Nicolopoulos I. S., Parsons C.G. et al. // *Excitatory amino acid transmission*, Ed. T.P. Hicks, D. Lodge, H. McLennan, New York, Alan R. Liss. - 1987a. - P. 309-319.
- Headley P. M., Parsons C.G., West D.C. // *J. Physiol.* - 1987b. - Vol. 385. - P. 169-176.
- Heale V., Harley C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1990. - Vol. 36. - P. 145-149.
- Hearn T.J., Ganong A.H., Cotman C.W. // *Brain Res.* - 1986. - Vol. 379. - P. 372-376.
- Herberg L.J., Rose I.C. // *Psychopharmacology.* - 1989. - Vol. 99. - P. 87-90.
- Herberg L.J., Rose I.C. // *Behav. Brain Res.* - 1990. - Vol. 39. - P. 230-238.
- Herman B.H., Vocci F., Bridge P. // *Neuropsychopharmacology.* - 1995. - Vol. 13. - P. 269-293.
- Herrling P. L. // *Neurosci.* - 1985. - Vol. 14. - P. 417-426.
- Herrling P. L. // *The NMDA Receptors.* / Ed. J. C. Watkins, G.L. Collingridge, Oxford. - 1989. - P. 177-186.
- Herrling P. L. // *Arzneimittelforschung.* - 1992. - Vol. 42. - P. 202-208.
- Herting R.L. // *Drug Dev. Res.* - 1992. - Vol. 27. - P. 67-72.
- Hertz L. // *Progr. Neurobiol.* - 1979. - Vol. 13. - P. 277-323.
- Hicks T.P., Guedes R.C.A. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1981. - Vol. 59. - P. 893-896.
- Hicks T.P., Hall J. G., McLennan H. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1978. - Vol. 56. - P. 901-907.
- Hill R.G., Salt T.E. // *J. Physiol. (Lond.).* - 1982. - Vol. 327. - P. 65-78.
- Hirano T., Hagiwara S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1988. - Vol. 85. - P. 934-938.
- Hoffman P. L., Tabakoff B. // *Alcohol Alcohol Suppl.* - 1993. - Vol. 2. - P. 345-351.
- Hollmann M., Heinemann S. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1994. - Vol. 17. - P. 31-108.
- Holt I.L., Akeyson E.W., Knuepter M.M. // *Amer. J. Physiol.* - 1991. - Vol. 261. - P. 727-737.
- Hondo H., Nakahara T., Nakamura K. et al. // *Brain Res.* - 1995. - Vol. 671. - P. 54-62.
- Hong Y., Henry J. L. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 591. - P. 62-68.
- Honore T., Davies S.N., Drejer J. et al. // *Science.* - 1988. - Vol. 241. - P. 701-701.
- Honore T.A., Lauridsen J., Krogsgaard-Larsen P. // *J. Neurochem.* - 1982. - Vol. 38. - P. 173-178.
- Hopkins W.F., Johnston D.J. // *Neurophysiol.* - 1988. - Vol. 59. - P. 667-687.
- Hori N., Auker C.R., Braitman D.J. et al. // *J. Neurophysiol.* - 1991. - Vol. 48. - P. 1289-1301.
- Horvath Z., Buzsaki G. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1993. - Vol. 19. - P. 354.
- Huettnner J. E., Bean B.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1988. - Vol. 85. - P. 1307-1311.
- Huntley G.W., Vickers J. C., Morrison J. II // *Trends Neurosci.* - 1994. - Vol. 17. - P. 536-43.
- Ishida M., Saitoh T., Shimamoto K. et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 109. - P. 1169-1177.
- Ishii T., Moriyoshi K., Sugihara H. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 2836-2843.
- Iversen L. // *Neurotransmission.* - 1994. - Vol. 10. - P. 1-4.
- Jack J. J., Miller S., Porter R. et al. // *J. Physiol. Lond.* - 1971. - Vol. 215. - P. 353-380.
- Jackson H., Usherwood P. N.R. // *Trends Neurosci.* - 1988. - Vol. 11. - P. 278-283.
- Jacquet Y.F. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 154. - P. 271-276.
- Jaffe D., Johnston D. // *J. Neurophysiol.* - 1990. - Vol. 64. - P. 948-960.
- Jahr C.E., Yoshioka K. // *J. Physiol. (Lond.).* - 1994. - Vol. 370. - P. 515-530.
- Jahr C.E., Jessel A.R. // *J. Physiol. (Lond.).* - 1985. - Vol. 365. - P. 137-144.
- Jarrard L.E. // *Neuroscience.* - 1983. - Vol. 97. - P. 873-889.
- Jarvie P. A., Logan T.C., Geula C. et al. // *Brain Res.* - 1990. - Vol. 508. - P. 188-193.
- Jarvis M.F., Murphy D.E., Williams M. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 141. - P. 149-152.
- Javitt D.C., Zukin S.R. // *Am. J. Psych.* - 1991. - Vol. 148. - P. 1301-1308.
- Jay T.M., Thierry A.-M., Wiklund L. et al. // *Eur. J. of Neurosci.* - 1992. - Vol. 4. - P. 1285-1295.
- Jeftinija S. // *Neurosci. Lett.* - 1989. - Vol. 96. - P. 191-198.
- Jensen T.S., Yaksh T.L. // *Brain Res.* - 1989. - Vol. 476. - P. 1-9.
- Johnson J. W., Ascher P. // *Nature.* - 1987. - Vol. 325. - P. 329-331.

- Johnson R.L., Koerner J. E. // *J. Med. Chem.* - 1988. - Vol. 31. - P. 2057-2066.
- Johnston D., Williams S., Jaffe D. et al. // *Annu. Rev. Physiol.* - 1992. - Vol. 54. - P. 489-505.
- Johnston G.A.R., Curtis D.R., Davies J., McCulloch R.M. // *Nature*. - 1974. - Vol. 248. - P. 804-805.
- Jones M.C., Inis N.A., Lodge D. // *Br. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 101. - P. 968-970.
- Jones N.M., Lotacono R.E., Beart P. M. // *J. Neurochem.* - 1995. - Vol. 64. - P. 2057-2063.
- Jose Sanchez-Prieto, David C. Budd, Immaculada Herrero. *TINS*. 1996. Vol. 19. N 6 P 235-239.
- Kamitsaki Y., Inagak S., Tohyama M. et al // *Brain Res.* - 1984. - Vol. 297. - P. 363-368.
- Kano M., Kato M., Chang H.S. // *Neurosci. Res.* - 1988. - Vol. 5. - P. 325-337.
- Kapoor V., Nakahara D., Blood R.J. // *Neuroscience*. - 1990. - Vol. 31. - P. 187-191.
- Karcz-Kubicha M., Liljequist S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 279. - P. 171-177.
- Karcz-Kubicha M., Liljequist S. // *Psychopharmacology*. - 1995. - Vol. 120. - P. 49-56.
- Karler R., Calder L.D., Bedingsfield J. B. // *Psychopharmacology*. - 1994. - Vol. 115. - P. 305-310.
- Karler R., Calder L.D., Chaudhry I.A., Turkanis S.A. // *Life Sciences*. - 1989. - Vol. 45. - P. 599-606.
- Karp S., Mazu M., Eki T. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 3728-3733.
- Kase H., Iwahashi K., Nakanishi S. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1987. - Vol. 142. - P. 436-440.
- Kauer J. A., Nicoll R.A. // *Nature (Lond.)*. - 1988. - Vol. 334. - P. 250-252.
- Kawasaki K., Trainelis S.F., Dingledine R. // *J. Neurophysiol.* - 1990. - Vol. 63. - P. 385-394.
- Kelne J. H., McCloskey T.C., Baron B.M. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 193. - P. 283-292.
- Kemp J. A., Foster A.C., Leeson P. D. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1989. - Vol. 85. - P. 294-302.
- Kemp J. A., Grimwood S., Foster A.C. // *Br. J. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 91. - P. 314P.
- Kemp J. A., Leeson P. D. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1993. - Vol. 14. - P. 20-25.
- Kemp J. A., Sillito A.M. // *J. Physiol.* - 1988. - Vol. 323. - P. 377-391.
- Kerkerian L., Nieoullon A. // *Exp. Brain Res.* - 1988. - Vol. 69. - P. 424-430.
- Kerwin R.W., Patel S., Meldrum B.S. et al. // *Lancet*. - 1988. - Vol. 12. - P. 583-584.
- Kessler M., Tarramant T., Lynch G., Baudry M. // *J. Neurochem.* - 1989. - Vol. 52. - P. 1319-1328.
- Khanna J. M., Shah G., Weiner J. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 230. - P. 23-31.
- Kimura H., Okamoto K., Sakai Y. // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1985. - Vol. 365. - P. 103-119.
- King A.E., Nistri A., Rovira C. // *Neurosci. Lett.* - 1985. - Vol. 55. - P. 77-82.
- Kiskin N.J., Krishtal O.A., Tsyndrenko A. Ya. // *Neurosci. Lett.* - 1986. - Vol. 63. - P. 225-230.
- Kiskin N.J., Tsyndrenko A. Ya. Piotrovsky L.B. et al. // *NeuroReport*. - 1991. - Vol. 2. - P. 29-32.
- Kleckner D.W., Dingledine R. // *Science*. - 1988. - Vol. 241. - P. 835-837.
- Kleinschmidt A., Beer M.F., Singer M. // *Science*. - 1987. - Vol. 238. - P. 355-358.
- Klockgether T., Turski L. // *Ann. Neurol.* - 1990. - Vol. 28. - P. 539-546.
- Klockgether T., Turski L. // *Trends Neurosci.* - 1989. - Vol. 12. - P. 285-286.
- Knopfel T. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 426. - P. 212-224.
- Koek W., Colpaert F.C. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1990. - Vol. 252. - P. 349-357.
- Koek W., Colpaert F.C. // *Life Sci.* - 1991. - Vol. 49. - P. PL37-PL42.
- Koek W., Woods J. H., Colpaert F.C. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1990. - Vol. 250. - P. 100-109.
- Koek W., Woods J. H., Winger G.D. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. - Vol. 245. - P. 969-974.
- Koerner J. F., Cotman C.W. // *Brain Res.* - 1981. - Vol. 251. - P. 105-115.
- Kohler C., Schwarcz R. // *Neuroscience*. - 1983. - Vol. 8. - P. 819-835.
- Kolesnikov Y.A., Ferkany J., Pasternak G.W. // *Life Sci.* - 1993. Vol. 53. - P. 1489-1494.
- Kolesnikov Y.A., Maccechini M.-L., Pasternak G.W. // *Life Sci.* - 1994. - Vol. 55. - P. 1393-1398.
- Koller K.J., Coyle J. T. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 98. - P. 193-199.
- Kornhuber J., Weller M., Schoppmeyer K. et al. // *J. Neural. Transm. Suppl.* - 1994. - Vol. 43. - P. 91-104.
- Kosten T.A., DeCaprio J. L., Rosen M.I. // *Neuropsychopharmacology*. - 1995. - Vol. 13. - P. 323-333.
- Koyuncuoglu M., Gungor M., Sagduyu H., Aricioglu F. // *Pharmacol Biochem Behav.* - 1990. - Vol. 35. - P. 829-832.
- Koyuncuoglu M., Saydam B. // *Int. J. Clin. Pharmacol. Therapy Toxicol.* - 1990. - Vol. 28. - P. 147-152.
- Koyuncuoglu M., Saydam B. // *Int. J. Clin. Pharmacol. Therapy Toxicol.* - 1990. - Vol. 28. - P. 147-152.
- Kraus J. E., Yeh G.C., Bonhaus D.W. et al. // *J. Neurosci.* - 1994. - Vol. 14. - P. 4196-4205.
- Kristensen J. D., Svensson B., Gordh T. // *Pain*. - 1992. - Vol. 51. - P. 249-253.
- Kristensen J. D., Svensson B., Gordh T. // *Pain*. - 1992. - Vol. 51. - P. 249-253.
- Kristensen P., Suzdak P. D., Thomsen C. // *Neurosci. Lett.* - 1993. - Vol. 155. - P. 159-162.
- Krnjevic K., Phillis J. W. // *J. Physiol.* - 1963. - Vol. 165. - P. 274-304.
- Krogsgaard-Larsen P., Brehm L., Johansen J. S. et al. // *J. Med. Chem.* - 1986. - Vol. 28. - P. 673-678.
- Krogsgaard-Larsen P., Ferkany J. W., Nielsen E.O. et al. // *J. Med. Chem.* - 1991. - Vol. 34. - P. 123-130.
- Kubo H., Kihara M. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 87. - P. 69-74.
- Kubo T., Kihara M. - 1988. // *Neurosci. Lett.* - Vol. 87. - P. 69-74.
- Kubo T., Kihara M. // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 343. - P. 46-51.
- Kubo T., Kihara M., Misu Y. // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 343. - P. 46-51.

- Kunós G., Varga K. // *Clin. Exper. Hypertens.* - 1995. - Vol. 17. - P. 91-100.
- Kurihara H., Fujiwara S., Yasuda H., Tadokoro S. // *Jap. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 54. - P. 250-252.
- Kushner L., Lerner J., Zukin R., Bennett M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1988. - Vol. 85. - P. 3250-3254.
- Kvamme E. // In: *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central nervous System*. Eds. Hertz L., Kvamme E et al. New York. - 1983. - P. 51-67.
- Lahtinen H., Castren E., Miettinen R. et al. // *Neurochem.* - 1993. - Vol. 14. - P. 45-48.
- Lakshmanan J., Padmanaban G. // *J. Neurochem.* - 1991. - Vol. 29. - P. 1121-1125.
- Lalonde R., Cote C. // *Neurosci. and Biobehav. Rev.* - 1993a. - Vol. 17. - P. 79-84.
- Lalonde R., Joyal C.C. // *Guastavino. Rest. Neurol. Neurosci.* - 1993b. - Vol. 5. - P. 367-370.
- Lalonde R., Joyal C.C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1991. - Vol. 39. - P. 829-833.
- Lalonde R., Joyal C.C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1993c. - Vol. 44. - P. 539-545.
- Lanthorn T.H. // *Amino Acids.* - 1994. - Vol. 6. - P. 247.
- Lapin I.P., Politi V. // *Pharmacol. Res.* - 1993. - Vol. 28. - P. 129-134.
- Lapin I.P., Rogawski M.A. // *Life Science.* - 1992. - Vol. 50. - P. PL59-PL64.
- Lapin I.P., Ryzov I.V. // *J. Neural. Transm.* - 1990. - Vol. 82. - P. 55-65.
- Largent B.L., Gundlach A.L., Snyder S.H. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1986. - Vol. 239. - P. 739-748.
- Laruelle M., Abi-Dargham A., Casanova M.F. et al. // *Arch. Gen. Psychiatry.* - 1993. - Vol. 21. - P. 122-134.
- Laurie D.J., Seeburg P. H. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 268. - P. 335-45.
- Law-Tho D., Hirsch J. C., Crepel F. // *Neurosci. Res.* - 1994. - Vol. 21. - P. 151-160.
- Le Moine C., Normand E., Bloch B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* - 1991. - Vol. 88. - P. 4205-4209.
- Leach M.J., Marden C.M., Miller A.A. et al. // *Neuropharm.* - 1985. - Vol. 24. - P. 937-940.
- Leach M.J., Swan J. H., Eisenthal D. et al. // *Stroke.* - 1993. - Vol. 24. - P. 1063-1067.
- Leblhuber F. // *Acta. Med. Austriaca.* - 1994. - Vol. 21. - P. 104-106.
- Lee C.R., Benfield P. // *Drugs and Aging.* - 1994. - Vol. 4. - P. 257-273.
- Lee H., Choi B.H. // *Exper. Neurol.* - 1992. - Vol. 118. - P. 284-290.
- Leeson P. D., Baker R., Carling R.W. et al. // *J. Med. Chem.* - 1991. - Vol. 34. - P. 1243-1252.
- Leeson P. D., Carling R.W., Moore K.W. et al. // *J. Med. Chem.* - 1992. - Vol. 35. - P. 1954-1968.
- Leeson P. D., Iversen L.L. // *J. Med. Chem.* - 1994. - Vol. 37. - P. 4053-4067.
- Leff P. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1995. - Vol. 16. - P. 89-97.
- Lehmann J., Hutchinson A.J., McPherson S.E. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. - Vol. 246. - P. 65-75.
- Lei S., Wilcox G.L. // *Pain.* - 1990. - Vol. 5(SupP.). - P. S124.
- Lekieffre D., Callebert J., Plotkine M. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1992. - Vol. 137. - P. 78-82.
- Leonard J. P., Salpeter M.M. // *Exper. Neurol.* - 1982. - Vol. 76. - P. 199-207.
- Lester R.A., Tong G., Jahr C.E. // *J. Neurosci.* - 1993. - Vol. 13. - P. 1088-1096.
- Levi G., Raiteri M. // *Int. Rev. Neurobiol.* - 1976. - Vol. 19. - P. 51-74.
- Levin E., McGurk S.R., Rose J. E. et al. // *Behav. Neural. Biol.* - 1990. - Vol. 54. - P. 271-299.
- Levy R.A., Goldstein B.D., Elyjiw M.M. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1981. - Vol. 71. - P. 139-142.
- Liebmam J. M., Bennett D.A. // *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research* /Eds. E.A. Cavalheiro, J. Lehmann, L. Turski. New York. - 1988. - P. 301-308.
- Liljequist S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 192. - P. 197-198.
- Linden D.J., Wong K.L., Sheu F.S. et al. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 458. - P. 142-146.
- Lipton S.A. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 1994a. - Vol. 747. - P. 205-224.
- Lipton S.A. // *Mol. Neurobiol.* - 1994b. - Vol. 8. - P. 181-196.
- Lipton S.A., Sucher N.J., Kaiser P. K., Dreyer E.B. // *Neuron.* - 1991. - Vol. 7. - P. 111-118.
- Littman L., Glatt B.S., Robinson M.B. // *J. Neurochem.* - 1993. - Vol. 61. - P. 586-593.
- Livezey R. T., Pearce L.B., Kornetsky C. // *Brain Res.* - 1995. Vol. 692. - P. 93-98.
- Liu C.-J., Grandes P., Matute C. et al. // *Histochemistry.* - 1989. - Vol. 90. - P. 427.
- Lodge D., Curtis D.R., Johnston G.A.R., Bornstein J. C. // *Brain Res.* - 1980. - Vol. 182. - P. 491-495.
- Lodge D., Johnson K.M. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1990. - Vol. 11. - P. 81-86.
- Lodge D., Jones M.G., Palmer A.J. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 69. - P. 1123-1128.
- Lombardi G., Moroni F., Moroni F. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 27. - P. 489-495.
- Lomo T. // *Acta Physiol.* - 1966. - Vol. 68. - P. 128.
- London E.P., Coyle J. T. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1979. - Vol. 56. - P. 287-290.
- Long S.R., Evans R.H., Cull L. // *Neuropharmacol.* - 1988. - Vol. 27. - P. 541-546.
- Loscher W., Honack D. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1991. - Vol. 257. - P. 1146-1153.
- Loscher W., Honack D. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 215. - P. 199-206.
- Loscher W., Honack D. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 234. - P. 237-245.

- Loscher W., Rundfeldt C., Honack D. // *Eur. J. Neurosci.* - 1993. - Vol. 5. - P. 1545-1550.
 Lowe D.A., Emre M., Frey P. et al. // *Neurochem. Int.* - 1994. - Vol. 25. - P. 583-600.
 Lubetzk C. // *J. Neuroradiol.* - 1995. - Vol. 22. - P. 169-171.
 Lukas D.R., Newhouse J. P. // *Arch. Ophthalmol.* - 1957. - Vol. 58. - P. 193-201.
 Lund-Karlsen R., Fonnum F. // *Acta Pharmacol. Toxicol.* - 1976. - Vol. 38. - P. 299-307.
 Lunn W.H.W., Schoepp D.D., Calligaro D.O. et al. // *J. Med. Chem.* - 1992. - Vol. 35. - P. 4608-4612.
 Lustig Y.S., Chan J., Greenberg D.A. // *Neurosci. Lett.* - 1992. - Vol. 135. - P. 259-261.
 Lutfy K., Hurlbut D.E., Weber E. // *Brain Res.* - 1993. 616 - P. 83-88.
 Lutfy K., Shen K.Z., Kwon I.S. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 273. - P. 187-190.
 Lynch G., Baudry M. // *Science.* - 1983. - Vol. 224. - P. 1057-1063.
 Lynch D.R., Anegawa N.J., Verdoorn T., Pritchett D.B. // *Mol. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 45. - P. 540-545.
 Lynch D.R., Lawrence J. J., Lenz S. et al. // *J. Neurochem.* - 1995. - Vol. 64. - P. 1462-1468.
 Lynch G., Baudry M. // *Science.* - 1992. - Vol. 224. - P. 1057-1063.
 Lynn B., Carpenter S.E. // *Brain Res.* - 1982. - Vol. 238. - P. 29-43.
 MacDonald J. F., Nistri A., Padgen A.L. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1977. - Vol. 55. - P. 1387-1390.
 Madden S.C., Woods R.R., Shull J. T. et al. // *J. Exper. Med.* - 1945. - Vol. 81. - P. 439-447.
 Madison D.V., Malenka R.C., Nicoll R.A. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1991. - Vol. 14. - P. 379-397.
 Madsen U., Ebert B., Krogsgaard L. et al. // *Biomed. Pharmacother.* - 1994. - Vol. 48. - P. 305-311.
 Madsen U., Wong E.H. // *J. Med. Chem.* - 1992. - Vol. 35. - P. 107-111.
 Malthé-Sorensen D., Skrebe K.K., Fonnum F. // *Neuroscience.* - 1980. - Vol. 5. - P. 127-133.
 Malva J. O., Ambrosio A.F., Cunha R.A. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1995. - Vol. 185. - P. 83-86.
 Manallack D.T., Beart P. M. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 144. - P. 231-235.
 Mansbach R.S., Willetts J., Jortani S.A., Balster R.L. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1991. Vol. 39. - P. 977-981.
 Mao J., Mayer D.J., Hayes R.L. et al. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 598. - P. 271-278.
 Mao J., Price D.D., Hayes R.L. et al. // *Brain Res.* - 1993. - Vol. 605. - P. 164-168.
 Mao J., Price D.D., Mayer D.J. // *J. Neurosci.* - 1994. - Vol. 14. - P. 2301-2312.
 Mao J., Price D.D., Mayer D.J. // *Pain.* - 1995. - Vol. 62. - P. 259-274.
 Maragos W.F., Chu D.C.M., Greenamyre J. T. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1986. - Vol. 123. - P. 173-174.
 Maragos W.F., Penney J. B., Young A.B. // *J. Neurosci.* - 1988. - Vol. 8. - P. 493-501.
 Marek P., Ben-Eliyahu S., Gold M.S., Liebeskind J. C. // *Brain Res.* - 1991a. - Vol. 547. - P. 77-81.
 Marek P., Ben-Eliyahu S., Vaccarino A.L., Liebeskind J. C. // *Brain Res.* - 1991b. - Vol. 558. - P. 163-165.
 Marescaux C., Vergnes M., Depaulis A. et al. // *In Neurotransmitters in Epilepsy. - Demos Publ. NY* - 1992. - P. 453-465.
 Markwell M.A.K., Berger S.P., Paul S.M. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 182. - P. 607-609.
 Martin D., Lodge D. // *Neuropharmacology.* - 1988. - Vol. 24. - P. 999-1003.
 Martin M.R. // *Neurosci. Lett. Suppl.* - 1985. - Vol. 22. - P. 430.
 Martinez-Rodriguez R., Fernandez B., Cevallos C., Gonzalez M. // *Brain Res.* - 1974. - Vol. 69. - P. 31-40.
 Marvizon J.C.G., Skolnick P. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. Vol. 151. - P. 157-158.
 Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K. et al. // *Nature.* - 1991. - Vol. 349. - P. 760-765.
 Matsuoka Y., Rakonczay Z., Giacobini E., Naritoku D. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1993. - Vol. 44. - P. 727-734.
 Matwyshyn G.A., Bhargava H.N. // *FASEB J. Abstr.* - 1995. - Vol. 9. - P. A102.
 Matwyshyn G.A., Thorat S.N., Barjavel M. et al. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1993. - Vol. 19. - P. 1461.
 Maura G., Carbone R., Raiteri M. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989. - Vol. 251. - P. 1142.
 Mayer M.L., Westbrook G.L. // *Progr. Neurobiol.* - 1987. - Vol. 28. - P. 197-276.
 Matsu M., Tanabe Y., Tsuchida K. et al. // *Nature* - 1991. - Vol. 329. - P. 836-838.
 McAllen R.M., Dampney R.A.L. // *Neurosci. Letters.* - 1990. - Vol. 110. - P. 91-96.
 McBain C.J., Kleckner N.W., Wyrick S., Dingledine R. // *Mol. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 36. - P. 556-565.
 McCloskey T.C., Paul B.K., Commissaris R.L. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1987. - Vol. 27. - P. 171-175.
 McCulloch J., Bullock R., Teasdale G.M. // *Excitatory Amino Acid Antagonists / Ed. Meldrum B., Oxford.* - 1992. - P. 287-326.
 McGaugh J. L., Introini-Collison I.B., Nagahara A.H. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 446. - P. 37-49.
 McLennan H., Lodge D. // *Brain Res.* - 1979. - Vol. 169. - P. 83-90.
 McMillan D.E. // *Fed. Proc.* - 1975. - Vol. 34. - P. 1870-1879.
 McMillan D.E., Hardwick W.C., deCosta B.R., Rice K.C. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1991. - Vol. 258. - P. 1015-1018.

- McNaughton B.L. // *J. Physiol. (Lond.)* - 1982. - Vol. 324. - P. 249-262.
- Meador-Woodruff J.H., Mansour A., Healy D.J. et al. // *Neuropsychopharmacol.* - 1991. - Vol. 5. - P. 231-242.
- Meffers B.A., Pullan L.M., Keith R.A. et al. // *Soc. Neurosci. Abstr.* - 1989. - Vol. 15. - P. 87.
- Meldrum B.S., Craggs M.D., Durmuller N. et al. // *In Mol. Neurobiol. Epilepsy* Elsevier Sci. Publ. - 1992. - P. 307-311.
- Meldrum B. // *Epilepsy Res.* - 1991a. - Vol. 10. - P. 55-61.
- Meldrum B., Garthwaite J. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1991b. - P. 54-62.
- Meldrum B.S. // *Clin. Sci.* - 1985. - Vol. 68. - P. 113-121.
- Meldrum B.S. // *Neurology*. - 1994. - Vol. 44 (Suppl. 8). - P. S14-23.
- Meldrum B.S., Chapman A.G., Patel S., Swan N. // *The NMDA Receptors*. / Ed. J. C. Watkins, G.L. Collingridge, Oxford. - 1989. - P. 207-216.
- Meldrum B.S., Garthwaite J. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1990. - Vol. 11. - P. 379-387.
- Meller S.T., Dykstra C.L., Gebhart G.F. // *Neuroreport*. - 1993. - Vol. 4. - P. 879-882.
- Meltzer H.Y. // *Psychopharmacology* - 1990. - Vol. 99. - S. 18.
- Melzak R., Wall P.D. // *Science*. - 1965. - Vol. 150. - P. 971-979.
- Mendell L.M. // *Exper. Neurol.* - 1966. - Vol. 16. - P. 316-322.
- Miljkovic Z., MacDonald J.F. // *Brain Res.* - 1986. - Vol. 376. - P. 396-399.
- Miller A.A., Sawyer D.A., Roth B. et al. // *New Anticonvulsant Drugs*. / London. - 1986. - P. 165-177.
- Miller R.J. // *Neuropsychopharmacology*. - 1994. - Vol. 10. - P. 620S.
- Minamoto Y., Itani T., Tokuda M. et al. // *Brain Res.* 1992. - Vol. 573. - P. 345-348.
- Minematsu K., Fisher M., Li L. et al. // *Neurology*. - 1993. - Vol. 43. - P. 397-403.
- Mitchell P.R., Doggett N.S. // *Life Sci.* - 1980. - Vol. 26. - P. 2073-2081.
- Mogenson G.J. // *Progr. Psychobiol. Physiol. Psychol.* - 1987. - Vol. 12. - P. 117-170.
- Monaghan D.T., Bridges R.J., Cotman C.W. // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1989. - Vol. 29. - P. 365-402.
- Monaghan D.T., Cotman C.W. // *J. Neurosci.* - 1985. - Vol. 5. - P. 2909-2919.
- Monaghan D.T., Olverman H.J., Nguyen L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1988. - Vol. 85. - P. 9836-9840.
- Mondadori C., Weiskrantz L. // *Behav. Neural Biol.* - 1993. - Vol. 60. - P. 205-210.
- Mondadori C., Weiskrantz L., Buerki H. et al. // *Exp. Brain Res.* - 1989. - Vol. 75. - P. 449-456.
- Monn J.A., Thurkauf A., Mattson M.V. et al. // *J. Med. Chem.* - 1990. - Vol. 33. - P. 1069-1076.
- Monnet F.P., Debonnel G., Montigny C. // *J. Pharm. Exper. Ther.* - 1992. - Vol. 361. - P. 123-130.
- Monyer H. // *Neuropsychopharmacology*. - 1994. - Vol. 10. - N 3S. - part 1. - P. 446S.
- Morelli M., Fenu S., Pinna A. et al. // *J. Pharm. Exper. Ther.* - 1992. - Vol. 260. - P. 402-408.
- Morelli M., Di Chiara G. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 182. - P. 611-612.
- Mori H., Masaki H., Yamakura T., Mishina M. // *Nature*. - 1992. - Vol. 358. P. 673-675.
- Moriyoshi K., Mazu M., Ishii T. et al. // *Nature*. - 1991. - Vol. 354. - P. 31-37.
- Morris R. // *Neurosci. Lett.* - 1984. - Vol. 105. - P. 79-85.
- Morris R.G.M., Anderson E., Lynch G.S., Baudry M. // *Nature*. - 1986. - Vol. 319. - P. 774-776.
- Moudy A.M., Yamada K.A., Rothman S.M. // *Neuropharmacology*. - 1994. - Vol. 33. - P. 953-962.
- Muller D., Turnbull J., Baudry M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1988. - Vol. 85. - P. 6997-7000.
- Murata S., Kawasaki K. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 239. - P. 9-17.
- Murphy S.N., Thager S.A., Miller R.J. // *J. Neurosci.* - 1987. - Vol. 7. - P. 4145-4158.
- Nadler J.V., Evenson D.A., Cuthberston G.J. // *Neuroscience*. - 1981. - Vol. 6. - P. 2505-2517.
- Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 11868-11873.
- Nakanishi S. // *Science*. - 1992. - Vol. 258. - P. 597-603.
- Nakanishi S., Masu M. // *Nature*. - 1990. - Vol. 346. - P. 269-271.
- Nakanishi S., Masu M., Bessho Y. et al. // *Neuropsychopharmacology* - 1994. - Vol. 10. - N3S. - P. 8S-13S.
- Nakanishi S., Masu M., Bessho Y. et al. // *EXS*. - 1994. - Vol. 71. - P. 71-80.
- Nankai M., Fage D., Carter C. // *J. Neurochem.* - 1995. - Vol. 64. - P. 2043-2048.
- Nasstrom J., Karlsson U., Post C. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 212. - P. 21-29.
- Nasstrom J., Karlsson U., Berge O.-G. // *Brain Res.* - 1993. - Vol. 623. - P. 47-55.
- Nelson P.G., Pun R.Y.K., Westbrook G.L. // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1986. - Vol. 372. - P. 169-190.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Alho H. et al. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 436. - P. 103-112.
- Nicoll R.A. // *Brain Res.* - 1975. - Vol. 96. - P. 119-123.
- Nicoletti E., Bruno V., Copani A. et al. // *Trends Neurosci.* - 1996. - Vol. 19. - P. 267-271.

- Nielsen E.O., Brehm L., Krogsgaard-Larsen P. et al. // *Eur. J. Med. Chem.* - 1986. - Vol. 21. - P. 433-437.
- Nicoullon A., Kerkerian L., Dusticier N. // *Life Sci.* - 1982. - Vol. 30. - P. 1165-1172.
- Noel F. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. - Vol. 247. - P. 1222-1232.
- Novelli A., Nicoletti F., Wroblewski J. T. // *J. Neurosci.* - 1987. - Vol. 7. - P. 40-47.
- Nowak L., Bregestovsky P., Ascher P. et al. // *Nature.* - 1984. - Vol. 307. - P. 462-465.
- Nunn P. B., Davis A.J., O'Brien P. // *Science.* - 1991. - Vol. 251. - P. 1619.
- Nunn P. B., Seelig M., Zagoren J. C., Spencer P. S. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 410. - P. 375-379.
- O'Connor J. J., Rowan M.J., Anwyl R. // *Nature.* - 1994. - Vol. 367. - P. 557-559.
- O'Hara P. J., Sheppard P. O., Thøgersen H. et al. // *Neuron.* - 1993. - Vol. 11. - P. 41-52.
- Ogita K., Ohkawara A., Suzuki T. et al. // *Neurochem. Int.* - 1992. - Vol. 21. - P. 135-47.
- Ogren S.O., Goldstein M. // *Neuropsychopharmacology.* - 1994. - Vol. 11. - P. 167-177.
- Ohishi H., Shigemoto R., Nakanishi S., Mizuno N. // *J. Comp. Neurol.* - 1993b. - Vol. 335. - P. 252-266.
- Ohishi H., Shigemoto R., Nakanishi S., Mizuno N. // *Neuroscience.* - 1993a. - Vol. 53. - P. 1009-1018.
- Ohmori J., Sakamoto S., Kubota H. et al. // *J. Med. Chem.* - 1994. - Vol. 37(4). - P. 467-75.
- Ohmori T., Abekawa T., Muraki A., Koyama T. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1994. - Vol. 48. - P. 587-591.
- Okamoto N., Hori S., Akazawa C., Hayashi Y. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1994. - Vol. 269. - P. 1231-1236.
- Olney J. W., Price M.T. / *In Glutamate as a Neurotransmitter*. NY. - 1981. - P. 423-432.
- Olney J. W. / *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. / Eds. McGeer E., Olney J. W., McGeer P., Raven Press. - 1978. - P. 95-121.
- Olney J. W. // *J. Neural. Transm. Suppl.* - 1994. - Vol. 43. - P. 47-51.
- Olney J. W., Farber N.B. // *Neuropsychopharmacology.* - 1995. - Vol. 13. - P. 335-345.
- Olney J. W., Labruyere J., Price M.T. // *Science.* - 1989. - Vol. 244. - P. 1360-1362.
- Olney J. W., Labruyere J., Wang G. et al. // *Science.* - 1991. - Vol. 254. - P. 1515-1518.
- Olney J. W., Price M.T., Salles K.S. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 141. - P. 357-361.
- Olverman H.J., Jones A.W., Watkins J. C. // *Nature.* - 1984. - Vol. 307. - P. 460-462.
- Olverman H.J., Monaghan D.T., Cotman C.W., Watkins J. C. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1986. - Vol. 131. - P. 161-162.
- Ornstein P. L., Schoepp D.D., Arnold M.B. et al. // *J. Med. Chem.* - 1991. - Vol. 34. - P. 90-97.
- Osawa Y., Davila J. C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1993. - Vol. 194. - P. 1435-1439.
- Padmanaban G., Cheema P. S., Malathi K., Lakshmanan J. // *J. Sci. Ind. Res.* - 1971. - Vol. 30. - P. 716-719.
- Palatologos G.I., Hertz L., Schoushoe A. // *J. Neurochem.* - 1988. - Vol. 51. - P. 317-320.
- Park K.M., Max M.B., Robinovitz E. et al. // *7th World Congress on Pain, IASP Publ.*, Seattle, W.A. - 1993. - P. 454.
- Paschen W., Rohm G., Meese C.O. et al. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 453. - P. 9-16.
- Passarella S., Atlante A., Barile M., Quagliariello E. // *Neurochem. Res.* - 1987. - Vol. 12. - P. 255-264.
- Patel S.V. // *J. Geriatr. Psychiatr. Neurol.* - 1995. - Vol. 8. - P. 81-95.
- Patneau D.K., Mayer M.L. // *Neuron.* - 1991. - Vol. 6. - P. 785-798.
- Pature L., Fage D., Fourrier O. et al. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 402. - P. 383-386.
- Pellow S., File S.E. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1986. - Vol. 24. - P. 525-529.
- Peoples R.W., Weight F.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1995. - Vol. 92. - P. 2825-2829.
- Petralia R.S., Wang Y.X., Wenthold R.J. // *J. Comp. Neurol.* - 1994. - Vol. 349. - P. 85-110.
- Petralia R.S., Wenthold R.J. // *J. Comp. Neurology.* - 1992. - Vol. 318. - P. 329-354.
- Protovsky L.B., Dumpis M.A., Garyaev A.P., Zaitsev Yu.V. // *Trends in Medicinal Chemistry'90* (Sarel S. et al. eds.). Blackwell Scientific Publications. - 1992. - P. 183-189.
- Protovsky L.B., Garyaev A.P., Dumpis M.A., Zaitsev Yu.V. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 197. - P. 157-160.
- Pizzi M., Fallacara C., Arrighi V. et al. // *J. Neurochem.* - 1993. - Vol. 61. - P. 683-689.
- Plaitakis A. / *The Olivopontocerebellar Atrophies*, ed. R.C. Davies, A. Plaitakis, New York, Raven Press. - 1984. - P. 225-243.
- Plaitakis A. // *Ann. Neurol.* - 1990. - Vol. 28. - P. 3-8.
- Plaitakis A., Berl S., Yahr M.D. // *Ann. Neurol.* - 1984. - Vol. 15. - P. 144-153.
- Plaitakis A., Constantakakis E. // *Brain Res. Bull.* 1993. - Vol. 30. - P. 381-386.
- Plaitakis A., Constantakakis E. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 68. - P. 2248-2259.
- Pongracz F., Poolos N.P., Kocsis J. D. et al. // *J. Neurophysiol.* - 1992. - Vol. 68. - P. 2248-2259.
- Poon M. // *J. Comp. Physiol.* - 1990. - Vol. 136. - P. 337-344.
- Porter J. H., Wiley J. L., Balster R.L. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989. - Vol. 248. - P. 998-1002.
- Porter R.H., Roberts P. J., Jane D.E., Watkins J. C. // *Br. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 106. - P. 509-510.
- Potashner S.J., Dymczyk L. // *J. Neurochem.* - 1986. - Vol. 47. - P. 412.

- Prehn J. H., Lippert K., Kriegstein J. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 292. - P. 179-189.
- Price D.D., Mao J., Frenk H., Mayer D.J. // *Pain.* - 1994. - Vol. 59. - P. 165-174.
- Priestley T., Kemp J. A. // *Mol. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 46(6). - P. 1191-1196.
- Puke M.J. C., Wiesebeid-Hallin Z. // *Anesth. Analg.* - 1993. - Vol. 77. - P. 104-109.
- Pullan L.M., Cler J. A // *Brain Res.* - 1989. - Vol. 497. - P. 56-63.
- Pulvirenti L., Maldonado-Lopez R., Koob G.F. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 594. - P. 327-336.
- Pulvirenti L., Swerdlow N.R., Koob G.F. // *Neurosci. Lett.* - 1989. - Vol. 103. - P. 213-219.
- Pulvirenti L., Swerdlow N.R., Koob G.F. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1991. - Vol. 40. - P. 841-845.
- Quarroz M., Durand J. // *Neurosci. Lett.* - 1991. - Vol. 125. - P. 5-8.
- Rabhan M., Wright J., Butterworth A.R., Zhou Q., Little H.J. // *Br. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 111. - P. 89-96.
- Raigorodsky G., Urea G. // *Brain Res.* - 1987. - Vol. 422. - P. 158-162.
- Raigorodsky G., Urea G. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 182. - P. 37-47.
- Raj A.S., Rao V.R. // *Cytologia.* - 1972. - Vol. 3. - P. 245-256.
- Randolph C., Roberts J. W., Tierney M.C. et al. // *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* - 1994. - Vol. 8. - P. 198-205.
- Ransom R.W., Stec N.L. // *J. Neurochem.* - 1988. - Vol. 51. - P. 830-836.
- Rao S.L.N. // *Biochemistry.* - 1975. - Vol. 14. - P. 5218-5221.
- Rao S.L.N. // *J. Neurochem.* - 1978. - Vol. 30. - P. 1467-1470.
- Rao S.L.N., Adiga P. R., Sarma D.S. // *Biochemistry.* - 1964. - Vol. 3. - P. 432-436.
- Rao T.S., Kim H.S., Lehmann J., Martin L.L., Wood P. L. // *Neuropharmacology.* - 1990. - Vol. 29. - P. 225-230.
- Rasmussen K. // *Neuropsychopharmacology.* - 1995. - Vol. 13. - P. 295-300.
- Rasmussen K., Beitner-Johnson D.B., Kristal J. H. et al. // *J. Neurosci.* - 1990. - Vol. 10. - P. 2308-2317.
- Rasmussen K., Brodsky M., Inturrisi C.E. // *Synapse.* - 1995. - Vol. 20. - P. 68-74.
- Rasmussen K., Fuller R.W., Stockton M.E. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 197. - P. 9-16.
- Rauschecker J. R., Hahn S. // *Nature.* - 1987. - Vol. 326. - P. 183-185.
- Ren K., Hylden J. L.K., Williams G.M. et al. // *Pain.* - 1992a. - Vol. 50. - P. 331-344.
- Ren K., Williams G.M., Hylden J. L.K. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992b. - Vol. 219. - P. 235-243.
- Reynolds I.J., Miller R.J. // *Mol. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 36. - P. 758-765.
- Reynolds I.J. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 177. - P. 215-216.
- Riaz A., Faingold C.L. // *Alcohol. Clin. Exper. Res.* - 1994. - Vol. 18. - P. 1456-62.
- Riveros N., Orrego F. // *Neuroscience.* - 1986. - Vol. 17. - P. 541-546.
- Roberts P.J. // *Nature.* - 1974. - Vol. 252. - P. 399.
- Robinson M.B., Sinor J. D., Dowd L.A., Kerwin J. F. Jr. // *J. Neurochem.* - 1993. - Vol. 60. - P. 167-79.
- Roche K.W., Raymond L.A., Blackstone C., Huganir R.L. // *J. Biol. Chem.* - 1994. - Vol. 269. - P. 11679-11682.
- Rogan M., Staubli U., LeDoux J. E. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1994. - Vol. 20. - P. 1007.
- Rogawski M.A. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1993. - Vol. 14. - P. 325-331.
- Rogawski M.A., Yamaguchi S.-I., Jones S.M. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1991. - Vol. 259. - P. 30-37.
- Rogers M., Dani J. A. // *Biophys. J.* - 1995. - Vol. 68. - P. 501-506.
- Rosen M.I., McMahon T.H., Woods S. et al. // *Neuropsychopharmacology.* - 1995. - Vol. 13. - P. 332-346.
- Ross S.M., Roy D.N., Spencer P. S. // *J. Neurochem.* - 1989. - Vol. 53. - P. 710-715.
- Ross S.M., Spencer P. S. // *Neurol. Neurobiol.* - 1995. - Vol. 46. - P. 517-524.
- Rothman S.M., Olney J. W. // *Annals Neurology.* - 1986. - Vol. 19. - P. 105-111.
- Rothman S.M., Olney J. W. // *Trends Neurosci.* - 1987. - Vol. 10. - P. 299-302.
- Rothstein J. D., Martin L.J., Kuncl R.W. // *New Eng. J. Med.* - 1992. - Vol. 326. - P. 1464-1468.
- Rowlands G.J., Roberts P. J. // *Exper. Brain Res.* - 1980. - Vol. 39. - P. 239-240.
- Rundfeldt C., Wlaz P., Loscher W. // *Brain Res.* - 1994. - Vol. 653(1-2). - P. 125-30.
- Sacaan A.I., Johnson K.M. // *Mol. Pharmacol.* - 1989b. - Vol. 36. - P. 836-839.
- Sacaan A.I., Johnson K.M. // *Soc. Neurosci. Abstr.* - 1989a. - Vol. 15. - P. 200.
- Sacaan A.I., Schoepp D.D. // *Neurosci. Lett.* - 1992. - Vol. 139. - P. 77-82.
- Saenz R., Tanner C.M., Albers G. et al. // *Neurology.* - 1993. - Vol. 43. - P. A155.
- Sakimura K., Bujo H., Kushiya E. et al. // *FEBS Letters.* - 1990. - Vol. 272. - P. 73-80.
- Salt T.E., Wilson D.G., Prasad S.K. // *Br. J. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 94. - P. 443-448.
- Salt T.E. // *Nature (Lond.).* - 1986b. - Vol. 481. - P. 499-510.
- Salt T.E., Hill R.G. // *Brain Res.* - 1986a. - Vol. 263. - P. 167-171.
- Sanchez-Prieto J., Budd D.C., Herrero I. // *Trends Neurosci.* - 1996. - Vol. 19. - P. 235-239.

- Sanger D.J., Jackson A. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989. - Vol. 248. - P. 1215-1221
- Sanger D.J., Zivkovic B. // *J. Psychopharmacol.* - 1989. - Vol. 3. - P. 198-204.
- Sanger D.J., Perrault G., Joly D., Morel E. // *Biological Psychiatry* (Racagni E. et al. eds.) 1991. - Vol. 2. - P. 748-750.
- Sanger D.J., Terry P., Katz J. L. // *Behav. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 3. - P. 265-268
- Sault J.E. // *Brain Res.* - 1989. - Vol. 481. - P. 403-406.
- Schank R.P., Bennet G.S., Freytag S.O. // *Brain Res.* - 1985. - Vol. 329. - P. 364-368
- Scharfman H.E., Schwartzkroin P. A. // *Science.* - 1989. - Vol. 246. - P. 257-260.
- Schenk S., Valadez A., McNamara C. et al. // *Psychopharmacology. Berl.* - 1993. - Vol. 111. - P. 332-338
- Schoepfer R., Monyer H., Sommer B. et al. // *Prog-Neurobiol.* - 1994. - Vol. 42. - P. 353-357.
- Schoepp D.D. // *Neurochem. Int.* - 1994a. - Vol. 24. - P. 439-449.
- Schoepp D.D. // *Neuropsychopharmacology.* - 1994b. - Vol. 10. - P. 624S.
- Schoepp D.D., Conn P. J. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1993. - Vol. 14. - P. 13-20.
- Schoepp D.D., Smith C.L., Lodge D. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 203. - P. 237-243.
- Schousboe A., Frandsen A., Wahl P., Krogsgaard-Larsen P. // *Neurotoxicology.* - 1994. - Vol. 15. - P. 477-81.
- Schwarcz R., Creese I., Coyle J. T. et al. - 1978. - Vol. 271. - P. 766-768.
- Seeburg P. H. // *Trends Neurosci.* - 1993. - Vol. 16. - P. 359-365
- Seeman P. // *Pharmacol. Rev.* - 1980. - Vol. 30. - P. 229.
- Segal D.S., Kuczenski R., Florin S.M. // *Behav. Neurosci.* - 1995. 109. - P. 532-546.
- Seguin L., Millan M.J. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 253. - P. R1-R3.
- Shank R.P., Aprison M.H. // In. - *Glutamine and glutamate in mammals.* - Vol. II. Boca Raton, FL. CRC Press. - 1988. - P. 3-19.
- Shank R.P., Campbell G.L.M. // *J. Neurochem.* - 1984. - Vol. 42. - P. 1153-1161.
- Sharp F.R., Butman M., Koistinaho J. et al. // *Neuroscience.* - 1994. - Vol. 62. - P. 1079-1092.
- Shaw G.G., Pateman A.J. // *J. Neurochem.* - 1973. - Vol. 20. - P. 1225-1230
- Shaw P. J., Ince P. G., Matthews J. N. et al. // *Brain-Res.* - 1994. - Vol. 637. - P. 297-302.
- Sheng M., Cummings J., Roldan L.A. et al. // *Nature.* - 1994. - Vol. 368. - P. 144-147.
- Sher G., Mitchell D. // *Brain Res.* - 1990. - Vol. 522. - P. 55-62.
- Sher G.D., Cartmell S.M., Gelgor L., Mitchell D. // *Pain.* - 1992. - Vol. 49. - P. 241-248.
- Sherman R.G., Atwood H.L. // *Science.* - 1971. - Vol. 171. - P. 1248-1250.
- Sherry F.D., Vaccarino A.L., Buckenham K. et al. // *Behav. Neurosci.* - 1989. - Vol. 103. - P. 308-318.
- Shiells R.A., Falk G. // *Proc. R. Soc., Lond. B.* - 1990. - Vol. 242. - P. 91-94.
- Shigemoto R., Nakanishi S., Mizuno N. // *J. Comp. Neurol.* - 1992. - Vol. 322. - P. 121-135.
- Shinozaki M. // *Progr. in Neurobiol.* - 1988. - Vol. 30. - P. 399-435.
- Shoemaker H., Allen J., Langer S.Z. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 176. - P. 249-250
- Shors T.J., Servatius R.J., Thompson R.F. et al. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1994. - Vol. 20. - P. 799.
- Siegel S.J., Janssen W.G., Tullai J. W. et al. // *J. Neurosci.* - 1995. - Vol. 15. - P. 2707-2719
- Simon J. R., Contrera J. F., Kuhar M.J. // *J. Neurochem.* - 1976. - Vol. 26. - P. 141-147.
- Simon R.P., Swan J. H., Griffiths T., Meldrum B.S. // *Science.* - 1985. - Vol. 226. - P. 850-852
- Simpson R.E., O'Regan M.H., Perkins L.M. et al. // *J. Neurochem.* - 1992. - Vol. 58. - P. 1683-1690
- Skilling S.R., Smullin D.H., Beitz A.J., Larson A.A. // *J. Neurochem.* - 1988. - Vol. 51. - P. 127-138.
- Skolnik P., Marvizon J. C.G., Jackson B.W. et al. // *Life Sci.* - 1989. - Vol. 45. - P. 1647-1655
- Sladeczek F., Pin J. -P., Recasens M. et al. // *Nature.* - 1985. - Vol. 317. - P. 717-719
- Slater N.T., Stelzer A., Galvan M. - 1985. - Vol. 60. P. 25-31.
- Slechte D.A. // *Psychopharmacol. Bull.* - 1994. - Vol. 30. - P. 601-612.
- Sloviter R.S. // *Brain Res. Bull.* - 1983. - Vol. 10. - P. 675-697.
- Smart T.G. // *Cell. Mol. Neurobiol.* - 1989. - Vol. 9. - P. 193.
- Smith S.E., Meldrum B.S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 211. - P. 109-111.
- Smith S.E., Meldrum B.S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 211. - P. 109-111.
- Smith P. F., Darlington C.L., Baillieres C.N. // *Clin. Neurol.* - 1994. - Vol. 3. - P. 467-484.
- Smith P. F., Darlington C.L., Baillieres C.N. // *Clin. Neurol.* - 1994. - Vol. 3. - P. 467-484.
- Sonsalla P. K., Nicklas W.J., Heikkila E. // *Science.* - 1988. - Vol. 243. - P. 398-400.
- Sosnowski M. // *Support. Care Cancer.* - 1993. - Vol. 1. - P. 79-88.
- Sosnowski M. // *Support. Care Cancer.* - 1993. - Vol. 1. - P. 79-88.
- Spencer P. S., Nunn P. D., Hugon J. et al. // *Lancet.* - 1986. - Vol. 1. - P. 965
- Spencer P. S., Nunn P. D., Hugon J. et al. // *Lancet.* - 1986. - Vol. 1. - P. 965
- Spierra R.F., Davies M. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 45. - P. 130-136
- Spierra R.F., Davies M. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 45. - P. 130-136
- Spreafico R., Frassoni C., Arcelli P. et al. // *Dev. Brain Res.* - 1994. - Vol. 82. - P. 231-244.
- Spreafico R., Frassoni C., Arcelli P. et al. // *Dev. Brain Res.* - 1994. - Vol. 82. - P. 231-244.
- Stallcup W.B., Bulloch K., Baetge E.E. // *J. Neurochem.* - 1979. - Vol. 32. - P. 57-65.
- Stallcup W.B., Bulloch K., Baetge E.E. // *J. Neurochem.* - 1979. - Vol. 32. - P. 57-65.
- Standaert D.G., Testa C.M., Young A.B., Penney J. B. // *J. Comp. Neurol.* - 1994. - Vol. 343. - P. 1-16.
- Standaert D.G., Testa C.M., Young A.B., Penney J. B. // *J. Comp. Neurol.* - 1994. - Vol. 343. - P. 1-16.
- Stannard C.F., Porter C.E. // *Pain.* - 1993. - Vol. 54. - P. 227-230.
- Stannard C.F., Porter C.E. // *Pain.* - 1993. - Vol. 54. - P. 227-230.
- Starr M.S., Starr B.S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 250. - P. 239-246.

- Starr M.S., Starr B.S. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 272. - P. 211-217.
- Stasheff S.F., Anderson W.W., Clark S. et al. // *Science* - 1989. - Vol. 245. - P. 648-651.
- Stasheff S.F., Bragdon A.C., Wilson W.A. // *Brain Res.* 1985. - Vol. 344. - P. 296-302.
- Staubli U., Thibault O., DiIorenzo M. et al. // *Behav. Neurosci.* - 1989. - Vol. 103. - P. 54-60.
- Staubli U., Ambros-Ingerson J., Lynch G. // *Hippocampus*. - 1992. - Vol. 2. - P. 49-58.
- Staubli U., Perez Y., Xu F.B., Rogers G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1994a. - Vol. 91. - P. 11158-11162.
- Staubli U., Rogers G., Lynch G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1994b. - Vol. 91. - P. 777-781.
- Steging L.D., Reynolds W.A. // *Glutamic Acid. - Adv. Biochem. Physiol. NY*. - 1979. - P. 85-102.
- Stephens D.N. // *Behav. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 6. - P. 425-446.
- Stephens D.N., Andrews J. S. / *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research*. / Eds. E.A. Cavalheiro, J. Lehmann, L. Turski, New York. - 1988. - P. 309-316.
- Stephens D.N., Meldrum B.S., Weidmann R. et al. // *Psychopharmacology*. - 1986. - Vol. 90. - P. 166-169.
- Stern-Bach Y., Betler B., Hartley M. et al. // *Neuron*. - 1994. - Vol. 13. - P. 1345-57.
- Stevens D.R., Cotman C.W. // *Brain Res.* - 1986. - Vol. 382. - P. 437-440.
- Steward O. // *J. Comp. Neurol.* - 1976. - Vol. 167. - P. 285-314.
- Stone T.W. // *Br. J. Pharmacol.* - 1979. - Vol. 67. - P. 545-551.
- Stone T.W. // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1976. - Vol. 257. - P. 187-198.
- Stone T.W. // *Pharmacol. Rev.* - 1993. - Vol. 45. - P. 309-378.
- Stone W.E., Javid M.J. // *Brain Res.* - 1983. - Vol. 264. - P. 165-167.
- Storm-Mathisen J., Ottersen O.P. / *Excitatory Amino Acids*, Eds. B.S. Meldrum, F. Moroni, R.P. Simon, J. H. Woods. - Fidia Research Foundation Symposium Series. - 1991. Vol. 5. - P. 29-43.
- Stutzmann J. M., Cintrat P., Laduron P. M., Blanchard J. C. // *Psychopharmacology*. - 1989. - Vol. 99. - P. 515-519.
- Sugihara H., Moriyoshi K., Ishii T. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1992. - Vol. 185. - P. 826-832.
- Sugiyama H., Ito J., Hirano C. // *Nature*. - 1987. - Vol. 325. - P. 531-533.
- Sun M.-K., Hackett J. T., Guynet P. G. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 438. - P. 23-40.
- Sutor B., Hablitz J. J. // *J. Neurophysiol.* - 1989. - Vol. 61. P. 621-634.
- Suzdak P. D., Sheardown M.J., Honore T. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 245. - P. 215-220.
- Suzdak P. D., Thomsen C., Kristensen P. // *Neuropsychopharmacology*. - 1994. - Vol. 10. - N 3S. - P. 622S.
- Sveinbjornsdottir S., Sander J. W., Upton D. et al. // *Epilepsy Res.* - 1993. - Vol. 16. - P. 165-74.
- Svensson A., Carlsson A., Carlsson M.L. // *J. Neural. Transm.* - 1992. - Vol. 90. - P. 199-217.
- Svensson A., Pileblad E., Carlsson M. // *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* - 1991. - Vol. 85. - P. 117-129.
- Swanson R.A., Shiraishi K., Morton M.T. et al. // *Stroke*. - 1990. - Vol. 21. - P. 322-327.
- Sweetnam P. M., Saab O.H., Wroblewski J. T. et al. // *Eur. J. Neurosci.* - 1993. - Vol. 5. - P. 276-283.
- Swintosky V.L., Mattson M.P. // *J. Neural. Transm. Suppl.* - 1994. - Vol. 44. - P. 29-45.
- Takahashi K., Tsuchida K., Tanabe Y. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 19341-19345.
- Takemoto T. // In: *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Eds.: McGeer E.G. et al. - NY. - Raven Press. - 1978. - P. 1-15.
- Takeuchi A., Takeuchi N. // *Adv. Biophys.* - 1972. - Vol. 3. - P. 45-95.
- Tal M., Bennett G.J. // *Neurosci. Lett.* - 1993. - Vol. 151. - P. 107-110.
- Tanabe Y., Mazu M., Ishii T. et al. // *Neuron*. - 1992. - Vol. 8. - P. 169-179.
- Tanabe Y., Nomura A., Mazu M. et al. // *J. Neurosci.* - 1993. - Vol. 13. - P. 1372-1378.
- Tang A.H., Schroeder L.A. // *Anesthesiology*. - 1973. - Vol. 39. - P. 37-43.
- Tanganelli S., Antonelli T., Morari M. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1991. - Vol. 122. - P. 270-272.
- Tarnava I., Engberg I., Flatman J. A. / *Amino Acids, Chemistry, Biology and Medicine*. / Ed. G. Lubec and G.A. Rosenthal. Leiden. - 1990. - P. 538-546.
- Tarnava I., Farkas S., Berzsenyi P. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 167. - P. 193-199.
- Teheci A.K. // *Brain Res.* - 1973. - Vol. 63. - P. 31-42.
- Teitelbaum J. S. et al. // *N. Engl. J. Med.* - 1990. - Vol. 322. - P. 1781-1787.
- Testa D., Caraceni T., Fetoni V. // *J. Neurol.* - 1989. - Vol. 236. - P. 445-447.
- Teyler T.G., Discenna P. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1987. - Vol. 10. - P. 131-161.
- Thio L.L., Clifford D.B., Zorumski C.F. // *J. Neurosci.* - 1991. - Vol. 11. - P. 3430-3441.
- Thomsen C., Suzdak P. D. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 245. - P. 299-301.
- Thomson A.M. // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1986. - Vol. 370. - P. 531-549.
- Thomson A.M. // *Prog. Neurobiol.* - 1990. - Vol. 35. - P. 53-74.
- Thorat S.N., Barjavel M., Matwysyn G.A., Bhargava H.N. // *Brain Res.* - 1994. - Vol. 642. - P. 153-159.
- Thorat S.N., Bhargava H.N. // *FASEB J. Abstr.* - 1995. - Vol. 9. - P. A102.

- Fiedtke P. I., Bischoff C., Schmidt W.J. // *J. Neural. Transm.* - 1990. - Vol. 81 - P. 173.
- Fiseo P. J., Cheng J., Pasternak G.W., Inturrisi C.E. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1994. - Vol. 268. - P. 195-201.
- Fiseo P. J., Inturrisi C.E. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 264 - P. 1090-1096.
- Flle I R., Castro-Lopes J. M., Coimbra A., Zieglgansberger W. // *Pain* - 1990. - Vol. 5 (Suppl.). - P. S229.
- Foma C., Dickinson-Anson H., McGaugh J. L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1992. - Vol. 89. - P. 3615-3619.
- Fricklebank M.D., Bristow L.J., Hutson P. H. et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 113 - P. 729-736.
- Fricklebank M.D., Singh L., Oles R.J. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 167. - P. 127-135.
- Trujillo K.A., Akil H. // *Science.* - 1991a. - Vol. 251. - P. 85-87.
- Trujillo K.A., Akil H. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1991b. - Vol. 38. - P. 673-675.
- Trujillo K.A., Akil H. // *Brain Res.* - 1994. - Vol. 633. - P. 178-188.
- Trujillo K.A., Akil H. // *Drug Alcohol Depend.* - 1995. - Vol. 38. - P. 139-154.
- Trullas R., Folio T., Young A. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 203. - P. 379-385.
- Trullas R., Jackson B., Skolnick P. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1989. - Vol. 34. - P. 313-316.
- Tsumoto T., Masui H., Sato H. // *J. Neurophysiol.* - 1986. - Vol. 55. - P. 469-483.
- Tsumoto T., Hahihara K., Sato H., Hata J. // *Nature.* - 1987. - Vol. 327. - P. 513-514.
- Tsumoto T. // *Neurosci. Res.* - 1990. - Vol. 9. - P. 79.
- Turski L., Bressler K., Rettig K.-J. // 115th Meeting of the American Neurological Association, Atlanta, GA, October 1990.
- Turski L., Bressler K., Rettig K.-J. // 115th Meeting of the American Neurological Association, Atlanta, GA, October 1990.
- Turski L., Klockgether T., Schwarz M. et al. // *Neuroscience.* - 1987. - Vol. 20. - P. 2285-2293.
- Turski W.A., Nakamura M., Todd W.P. et al. // *Brain Res.* - 1988. - Vol. 454. - P. 164-169.
- Ulas J., Weilmuller F.B., Brunner L.C. et al. // *J. Neurosci.* - 1994. - Vol. 14. - P. 6317-6324.
- Upton N. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1994. - Vol. 15. - P. 456-463.
- Urea G., Raigorodsky G. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 153. - P. 211-220.
- Usherwood P. N.R. // *Excitatory Amino Acids*, Eds. B.S. Meldrum, F. Moroni, R.P. Simon, J. H. Woods. - Fidia Research Foundation Symposium Series. - 1991. - Vol. 5. - P. 379-395.
- Vanvakides A. // *Ann. Pharmacol. Fr.* - 1987. - Vol. 45. - P. 389-400.
- van den Berg C.J., Garfinkel D. // *Biochem. J.* - 1978. - Vol. 123. - P. 211-218.
- Vaupel D.B., Kimes A.S., London E.D. // *Neuropsychopharmacology.* - 1995. - Vol. 13 - P. 315-322.
- Venable N., Kelly P. H. // *Psychopharmacology (Berl.).* - 1990. - Vol. 100. - P. 215-221.
- Verdoorn T.A., Dingledine R. // *Mol. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 34. - P. 298-303.
- Vickers J. C., Huntley G.W., Hof P. R. et al. // *Brain Res.* - 1995. - Vol. 671. - P. 175-80.
- Vyklicky L.J., Patneau D.K., Mayer M.L. // *Neuron.* - 1991. - Vol. 7. - P. 971-984.
- Walaas I., Fonnum F. // *Neuroscience.* - 1980. - Vol. 5. - P. 1691-1698.
- Walther H., Lambert J. D.C., Jones R.S.G. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1986. - Vol. 69. - P. 156-161.
- Wanaka O.E. // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 1989. - Vol. 236. - P. 373-384.
- Waniewski R.A., Martin D.L. // *Brain Res.* - 1983. - Vol. 268. - P. 390-394.
- Wasterlain C.G., Adams L.M., Hattori H., Schwartz P. II. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 212. - P. 275-278.
- Watkins J. C., Davies J. // *Brain Res.* 1973. - Vol. 59. P. 311-322.
- Watkins J. C. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 69. - P. 1064-75.
- Watkins J. C., Evans R.H. // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1981. - Vol. 21. - P. 165-204.
- Watkins J. C., Olvermann H.J. // *Excitatory Amino Acids in Health and Disease*, J. Wiley & Sons. - 1988. - P. 13-45.
- Watkins J. C., Olvermann H.J. // *Trends Neurosci.* - 1987. - Vol. 10. - P. 265-271.
- Watson G.B., Hood W.F., Monahan J. B., Lanthorn T.H. // *Neurosci. Res. Commun.* - 1988. - Vol. 2. - P. 169-174.
- Watson G.B., Rader R.K., Lanthorne T.H. // *Brain Res.* - 1989. - Vol. 498. - P. 81-88.
- Waziri R. // *Biol. Psychiatr.* - 1988. - Vol. 23. - P. 209-214.
- Weight F.F., Li C., Peoples R.W. et al. // *Abstracts of Conference "Neurochemistry and Pharmacology of Drug Addiction and Alcoholism"*, St.-Petersburg. - 1996. - P. 52-53.
- Weight F.F., Peoples R.W., Wright J. M. et al. // *Alcohol Suppl.* - 1993. - Vol. 2. - P. 353-358.
- Weiler I.J., Greenough W.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1993. - Vol. 90. - P. 7168-7171.
- Weiloch T. // *Science.* - 1985. - Vol. 230. - P. 681-683.
- Weiss J. H., Koh J. -Y., Choi D.V. // *Brain Res.* - 1989. - Vol. 497. - P. 64-71.

- Wenger G.R. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1980. - Vol. 12. - P. 665-670.
- Wentholt R.J. // *Brain Res.* - 1980. - Vol. 190. - P. 293-297.
- Westerink B.H.C., Santiago M., De Vries J. B. // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 345. - P. 523-529.
- Westlund K.N., McNeill D.L., Petterson J. T. // *Brain Res.* - 1992. - Vol. 489. - P. 347.
- Wieraszko A., Ball G.F. // *Synapse* 1993. - Vol. 13. - P. 173-178.
- Wigstrom H., Gustaffson B., Huang Y.Y. // *Acta Physiol.Scand.* - 1985. - Vol. 124. - P. 175-178.
- Wiklund L., Behzadi G., Kalen P. et al. // *Neurosci. Lett.* - 1988. - Vol. 93. - P. 158-163.
- Wiley J. L., Balster R.L. // *Psychopharmacology.* - 1994. - Vol. 116. - P. 266-272.
- Wiley J. L., Balster R.L. / *Anxiety: Neurobiology, Clinic and Therapeutic Perspectives* / Eds. M. Hamon, H. Ollat, M.-H. Thiebot. - Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. - 1993. - Vol. 232. - P. 177-184.
- Wiley J. L., Balster R.L. / *Multiple Sigma and PCP Receptor Ligands. - Mechanisms for Neuromodulation and Neuroprotection?* / Eds. J. M. Kamenka, E.F. Domino., Ann Arbor. - 1992a. - P. 801-815.
- Wiley J. L., Compton A.D., Porter J. H., Balster R.L. // *Life Sci.* - 1992b. - Vol. 50. - P. 1519-1528.
- Wiley J. L., Cristello A.F., Balster R.L. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 294. - P. 101-107.
- Wiley J. L., Porter J. H., Compton A.D., Balster R.L. // *Abstr. Soc. Neurosci.* - 1990. - Vol. 16. - P. 1193.
- Willets J., Balster R.L. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989a. - Vol. 249. - P. 438-453.
- Willets J., Balster R.L. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1989b. - Vol. 251. - P. 627-633.
- Willets J., Balster R.L., Leander J. D. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1990. - Vol. 11. - P. 423-428.
- Willets J., Bobelis D.J., Balster R.L. // *Psychopharmacology.* - 1989c. - Vol. 99. - P. 458-462.
- Willets J., Clissold D.B., Hartman T.L. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 264. - P. 256-264.
- Willets J., Tokarz M.E., Balster R.L. // *Life Sci.* - 1991. - Vol. 48. - P. 1795-1798.
- Williams B.J., Leeson P. D., Hammah G., Baker R. // *J. Chem.Soc., Chem.Comm.* - 1989. - P. 1740-1742.
- Williams K. // *Mol. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 44. - P. 851-859.
- Williams K., Romano C., Molinoff P. B. // *Mol.Pharmacol.* 1989. - Vol. 36. - P. 575-581.
- Willins D.L., Wallace L.J., Miller D.D. et al. // *J. Pharm.Exper. Ther.* - 1992. - Vol. 260. - N.3. - P. 1145-1151.
- Willis W.D, Coggeshall R.E. / *Sensory mechanisms of the spinal cord*, New York, London, Plenum Press. - 1991, 575 P.
- Wilmot C.A.// *Drug.Dev.Res.* - 1989. - Vol.17. - P.339-365.
- Wilsch V.W., Pidoplichko V.I., Reymann K.G. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 284. - P. 141-147.
- Winder D.G. Smith T., Conn P. J. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1993. - Vol. 266. - P. 518-525.
- Winslow J. T., Insel T.R., Trullas R., Skolnick P. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1990. - Vol. - 190. - P. 11-21.
- Wlaz P., Baran H., Loscher W. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 257. - P. 217-225.
- Wo Z.G., Oswald R.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1994. - Vol. 91. - P. 7154-7158.
- Wolf M.E., Dahlin S.L., Hu X.-T., Xue C.-J., White K. // *Neuroscience.* - 1995. - Vol. 69. - P. 417-439.
- Wolf M.E., Jeziorski M. // *Brain Res.* - 1993. - Vol. 613. - P. 291-294.
- Wong E.H.F., Kemp J. A. // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1991. - Vol. 31. - P. 401-425.
- Wong E.H.F., Kemp J. A., Priestley T. et al. // *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* - 1986. - Vol. 83. - P. 7104-7108.
- Woods J. H., France C.P., Hartman J., Baron S., Cook J. / *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research.* / Eds. E.A. Cavalheiro, J. Lehmann, L. Turski. New York. - 1988. - P. 317-323.
- Woods J. H., Koek W., France C.P., Moerschbacher J. M. / *Excitatory Amino Acid Antagonists* (Ed. B.S Meldrum), Oxford, Blackwell Scientific Publications Ltd., - P. 237-264.
- Woolf C.J., Thompson S.W.N. // *Pain* - 1991. - Vol. 44. - P. 293-299.
- Wozniak D.F., McEwen M., Sesma M.A. et al. // *Abstr. Soc. Neurosci* - 1993. - Vol. - 19. - P. 1770.
- Wozniak D.F., Olney J. W., Kettinger L. et al. // *Psychopharmacology.* - 1990. - Vol. 101. - P. 47-56.
- Wroblewska B., Wroblewski J. T., Saab O.H., Neale J. H. // *J. Neurochem.* - 1993. - Vol. 61. - P. 943-948.
- Wu G., Boulus S.B., Kim K.S., Haskell B.E. // *Phytochemistry.* - 1976. - Vol. 15. - P. 1251-1257.
- Xie C.W., Lewis V. // *J. Neurosci.* - 1995. - Vol. 15. - P. 3788-3795.
- Yaksh T.L. // *Pain.* - 1989. - Vol. 37. - P. 111-123.
- Yamada K.A., Tang C.M. // *J. Neurosci.* - 1993. - Vol. 13. - P. 3904-3915.
- Yamada, K.A., Rothman S.M. // *J. Physiol. (London).* - 1992. - Vol. 458. - P. 385-407.
- Yamamoto B.K., Davy S. // *J. Neurochem.* - 1992a. - Vol. 58. - P. 1736-1742.
- Yamamoto T., Yaksh T.L. // *Neurosci. Lett.* - 1992b. - Vol. 135. - P. 67-70.
- Ying-Bing L., Disterhoft J. F., Slater N.T. // *J. Neurophysiol.* - 1993. - Vol. 69. - P. 1000-1004.
- Yoneda Y., Suzuki T., Ogita K. // *J. Neurochem.* - 1994. - Vol. 62. - P. 102-12.
- Yoshimura M., Jessel T.M. // *J. Physiol.* - 1990. - Vol. 430. - P. 315-335.
- Young A.B., Fagg G.E. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1990. - Vol. 11. - P. 126-133.

- Young A.M., Goushaw P. J., Witte R.R., //Paper presented at 58th CPDD Meeting, June 22-27, 1996, San Juan, Puerto-Rico.
- Youngren K.D., Daly D.A., Moghaddam B. // J. Pharm. Exper. Ther. - 1993. - Vol. 264. - P. 289-293.
- Young R.S.K., Petroff O.A.C., William J. A. // Exper. Neurology. - 1991. - Vol. 111. - P. 362-368.
- Zaczek R., Koller K., Cotter R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1983. - Vol. 80. - P. 1116-1119
- Zalutsky R.A., Nicoll R.A. // Science. - 1990. - Vol. 248. - P. 1619-1624.
- Zarei M.M., Dani J. A. // J. Gen. Physiol. - 1994. - Vol. 103. - P. 231-48.
- Zhang J., Chiodo L.A., Freeman A.S. // Brain Res. - 1992. - Vol. 65. - P. 144-153.
- Zhang W.Q., Hudson P. M., Sobotka T.J. et al. // Brain Res. - 1991. - Vol. 540. - P. 315-318.
- Zieglansberger W., Satoh M. // Exp. Brain Res. - 1975. - Vol. 23. - P. 444.
- Zirkovic I., Thompson D.M., Bertolino M. et al. // J. Pharmacol. Exper. Ther. - 1995. - Vol. 272. - P. 300-309
- Zorumski C.F., Yamada K.A., Price M.T., Olney J. W. // Neuron. - 1993. - Vol. 10. - P. 61-67
- Zukin S.R., Javitt D.C. // NIDA Res. Monograph. - 1993. - Vol. 133. - P. 1-12
- Öye I., Mathisen L., Skjelbred P. // 7th World Congress on Pain, IASP Publ., Seattle, WA. - 1993. - P. 195.

В. И. Петров, Л. Б. Пиотровский, И. А. Григорьев
ВОЗБУЖДАЮЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

ЛР 161-229/06.03.94. Подписано в печать 08.01.97.
Формат 60 х 84/8. Печать офсетная. Усл. п. л. 19,53. Уч.-изд. л. 15,9.
Тираж 1000 экз. Заказ 367.

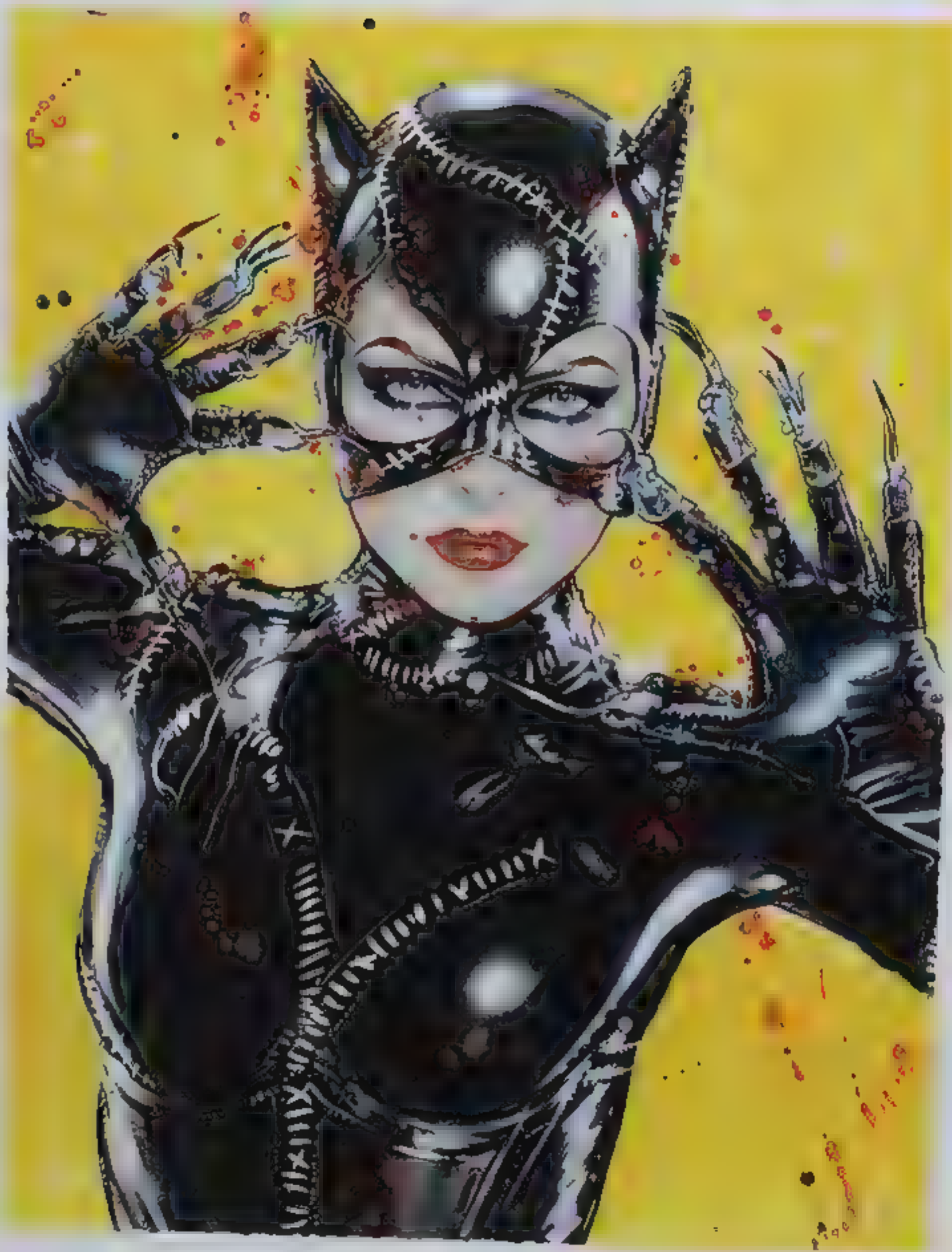
Издатель Волгоградская медицинская академия.
400066, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

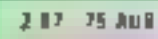
Отпечатано с готовых диапозитивов
Волгоградским полиграфическим производственным
предприятием «Офсет».
400001, Волгоград, ул. КИМ, 6.





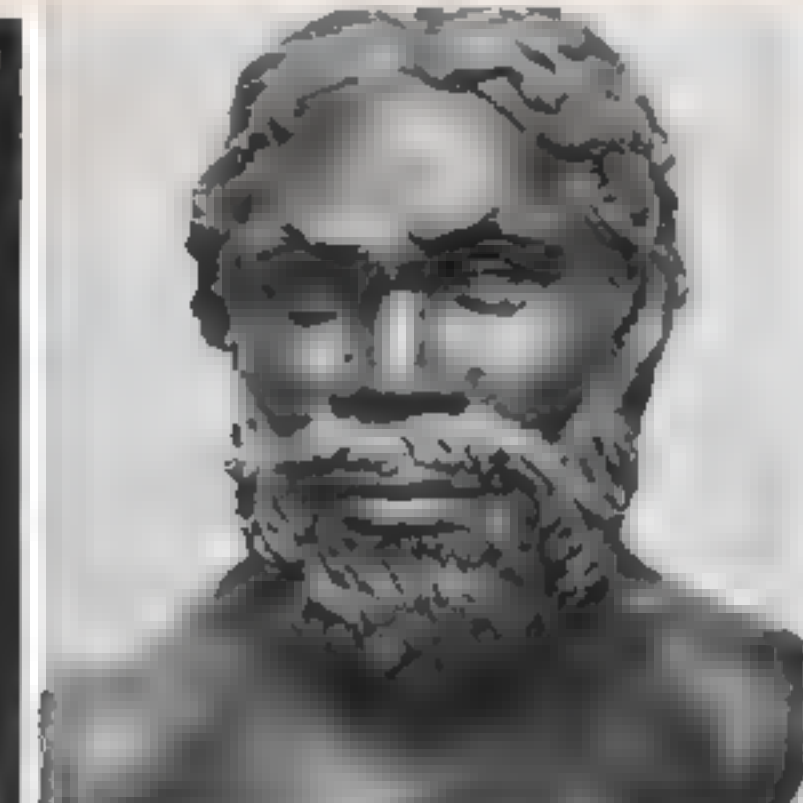
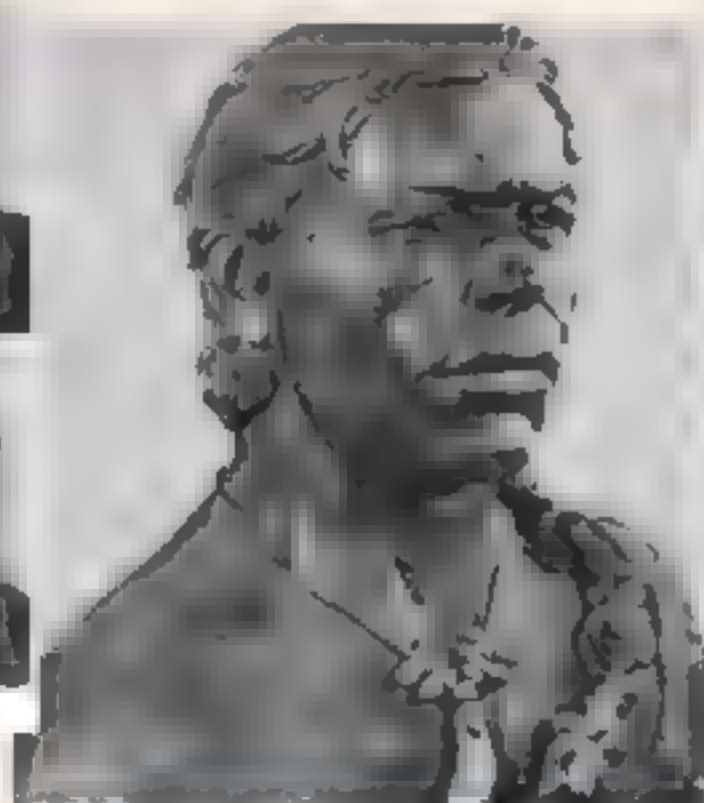
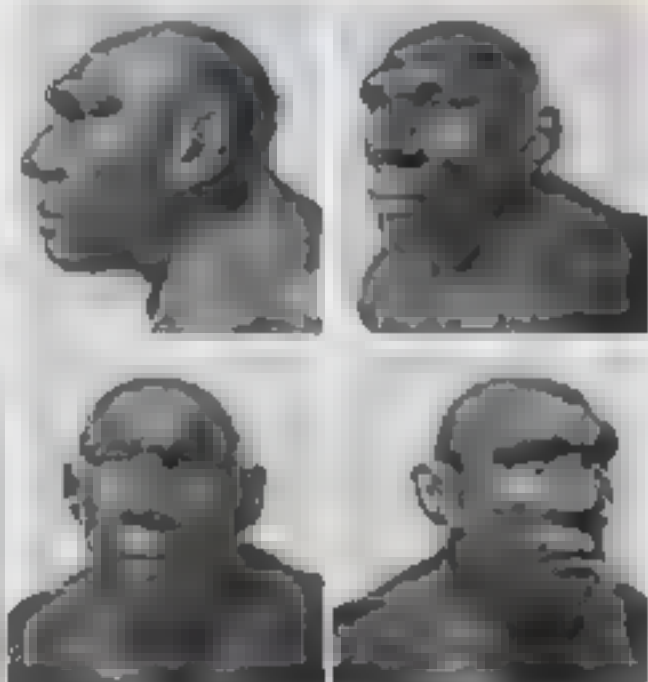
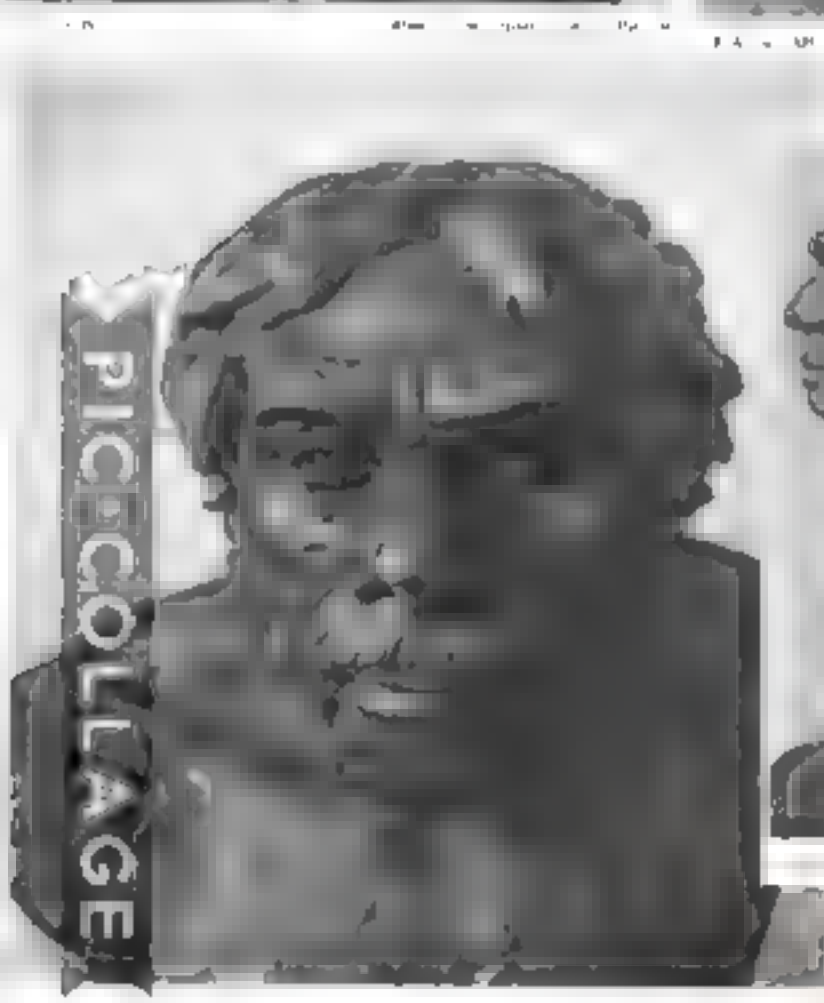
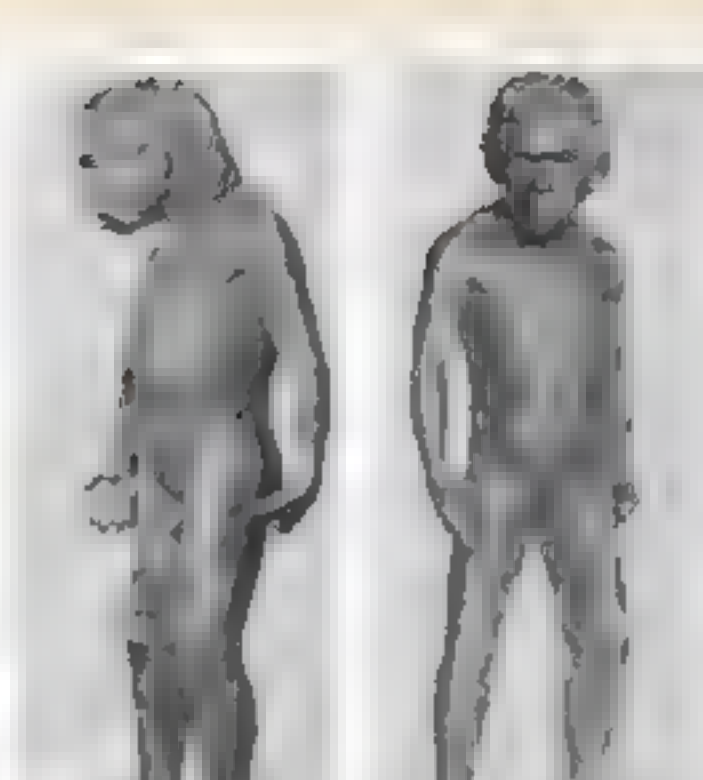
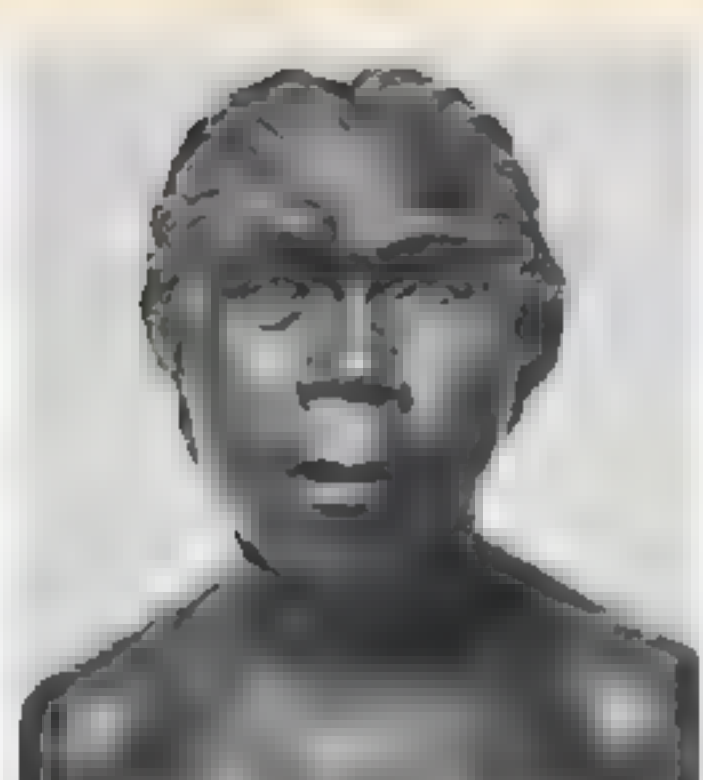
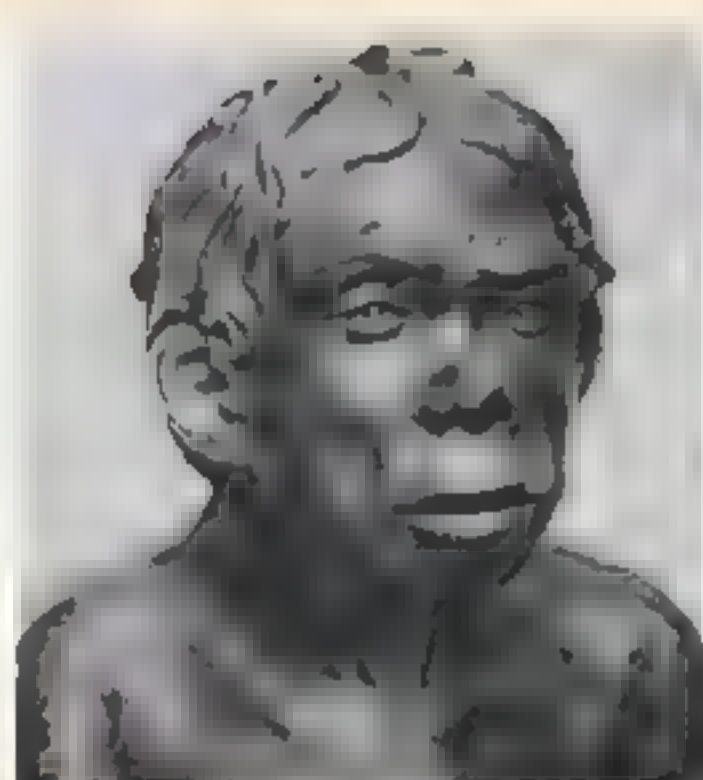
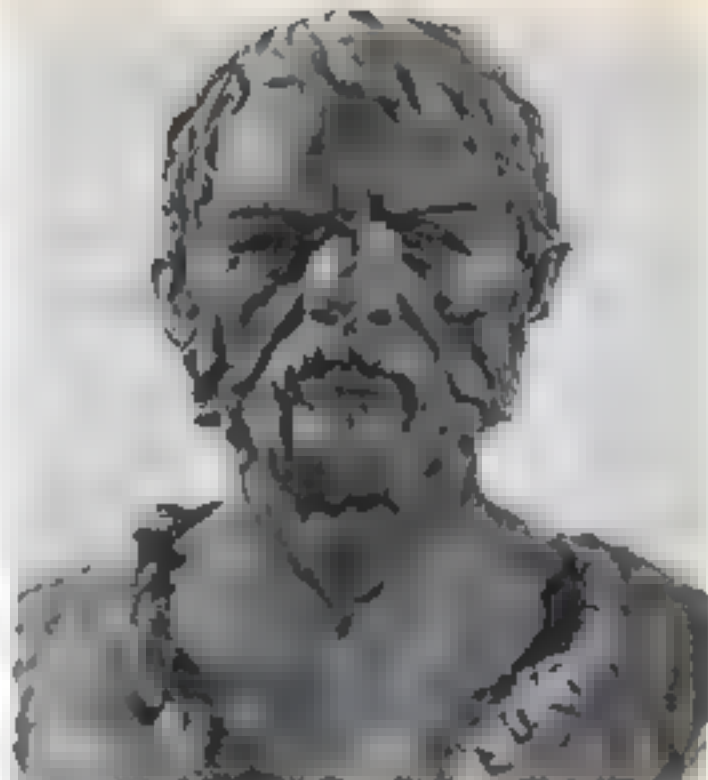
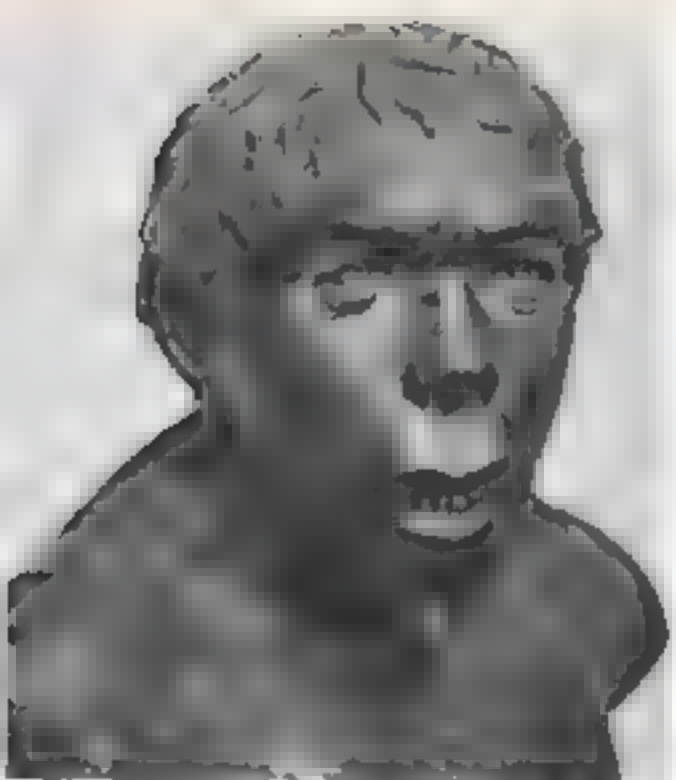
卷之四





Портреты Пещерных говорящих приматов из книги «люди Каменного века», автор М.М. Герасимов. 1964 г.

они действительно вымерли?



Современная гуманитарная академия

Н.С. Лобас

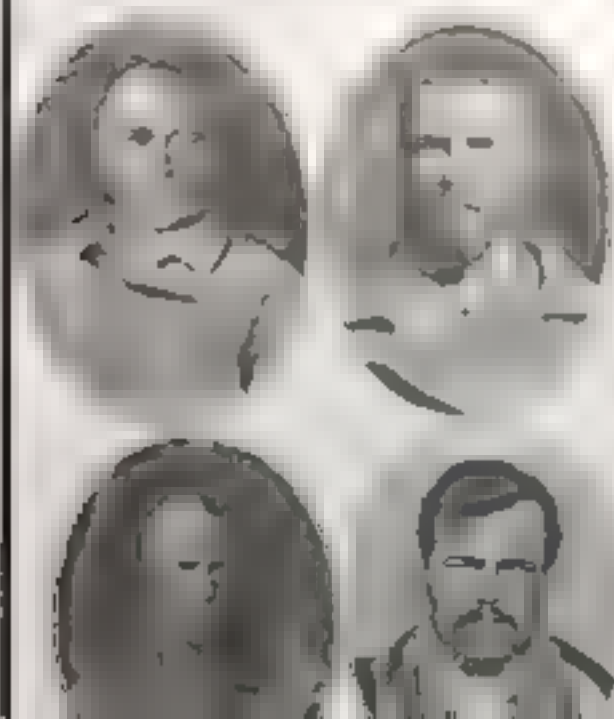
бывший врач сахалинских каторжных тюрем

УБИЙЦЫ

(Некоторые черты психофизики преступников
Со снимками преступников)

Москва 2008

PICTOCOLLAGE



АНТИ-СЛЭБИДСТВО. ИССЛЕДОВАНИЕ.



ЖЕНЩИНЫ-УБИЙЦЫ.

Dr. J. H. H.

П. Н. Тарновской

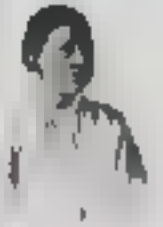
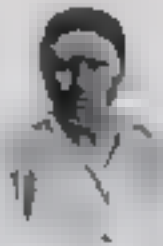
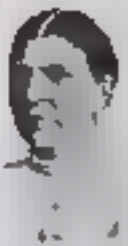
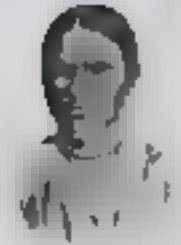
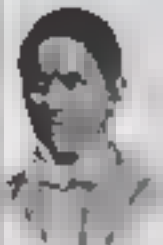
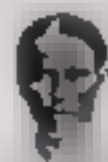
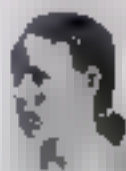
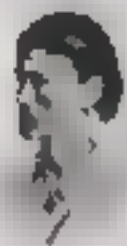
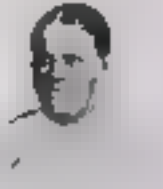
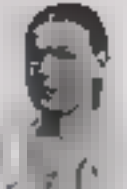
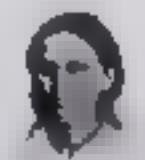
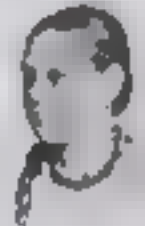
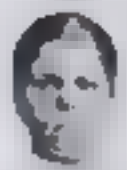
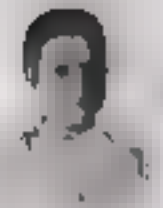
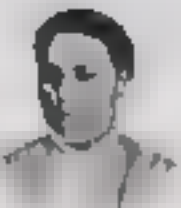
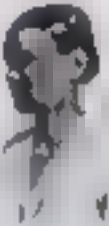
Сл. 153 г.и.д.у.и.к.и.и.и.

၆၆ အုပ်စု၊ ၂၀၀၇ ခုနှစ်၊ ဇူလိုင်လ ၁ ရက်နေ့



ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟ

අපේ සිද්ධි පමා නොවෙයි. අපේ සිද්ධි පමා නොවෙයි.

[illegible]









ANGELA MAO YING



Created By Tony Quatro



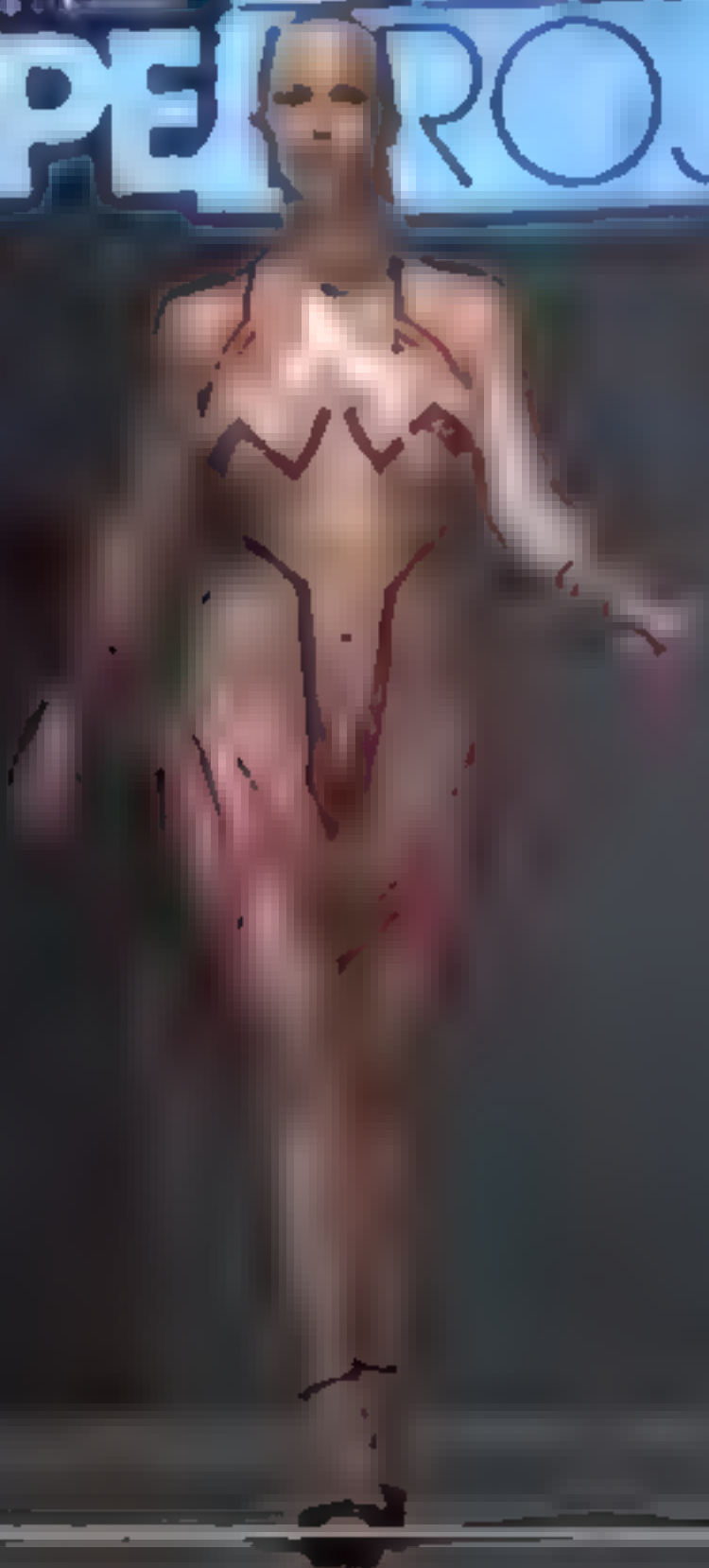
5:03 / 5:05





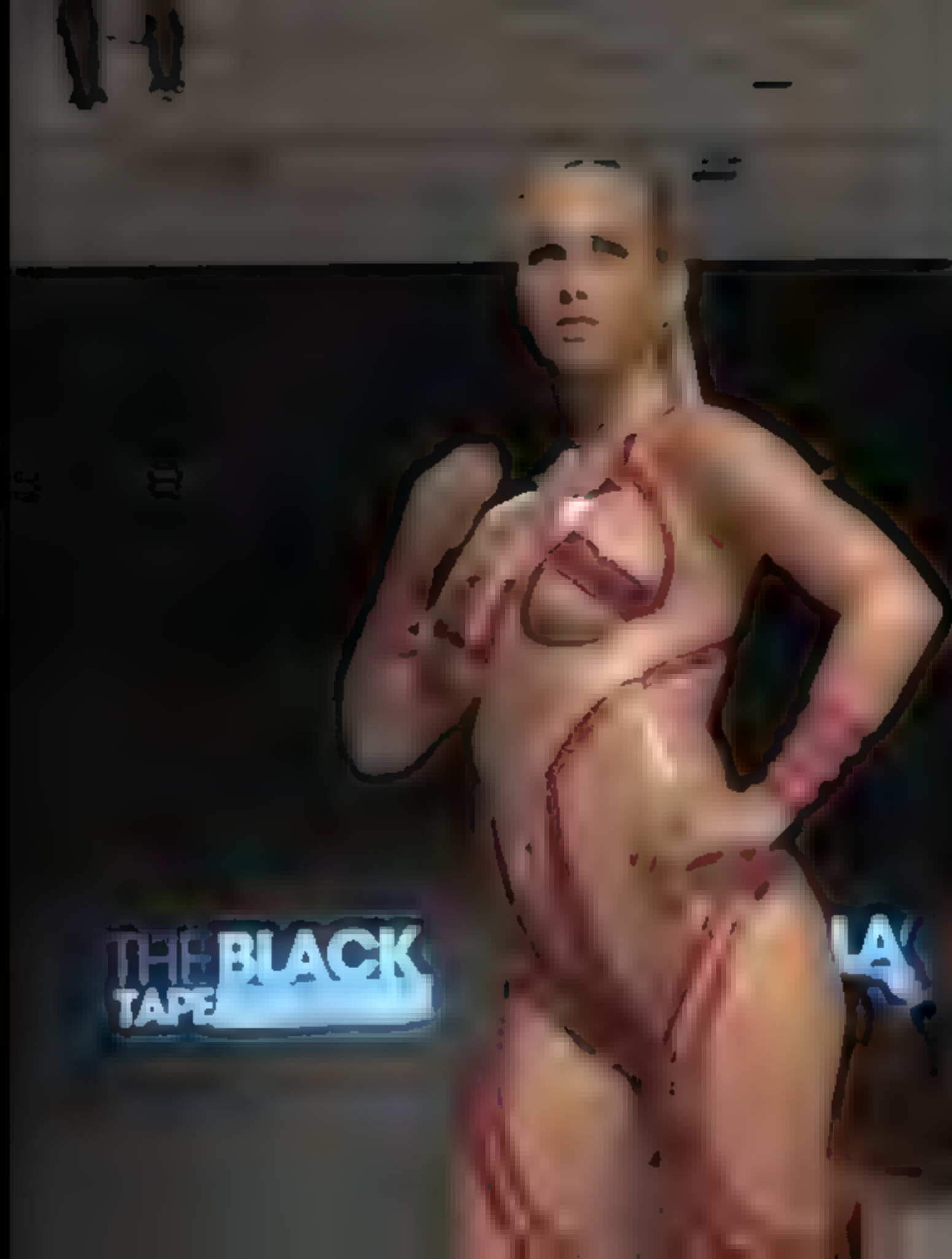


THE BLACK TAPE PROJECT



0:02 / 0:21















**ВСЕГДА
не верьте
тому что
кажется,
верьте
ТОЛЬКО
доказательствам.**



Чарльз Диккенс. «Большие надежды» 1861 г.